



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA  
ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL

## ASPECTOS DE LA FISIOLOGÍA DE *BETA VULGARIS* EN CONDICIONES DE SIEMBRA OTOÑAL

Trabajo de investigación presentado por la Lcda. **M<sup>a</sup> Aránzazu León Morillo** para optar al grado de Doctora en Biología

Sevilla 2015

Los directores de la Tesis

Dra. Cristina Echevarría Ruíz  
de Vargas

Catedrática de Universidad

Dr. Juan José Martínez  
Quesada

TechInCrop

Dra. Ana Belén Fera  
Bourrellier

Profesora de Universidad

El trabajo de campo, los diseños experimentales de las parcelas y la obtención de los parámetros agronómicos fueron supervisados por Rodrigo Morillo-Velarde (Director Gerente de AIMCRA) y desarrollados por Juan José Martínez Quesada, bajo la financiación e infraestructura de AIMCRA-Sevilla (Asociación de Investigación para la Mejora y Calidad de la Remolacha Azucarera).



Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología, en el Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

La financiación se realizó con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

- Convenio USE-Monte 99-04. "Estudio de los factores ambientales y fisiológicos que determinan la acumulación y calidad del azúcar de la remolacha de siembra otoñal".18.06.05.50.01. (2000/96).
- Contrato 68/83 USE-AIMCRA. "Efectos del estrés térmico sobre la calidad de la remolacha de siembra otoñal. Estudio de las bases fisiológicas".18-06.04.60.97. (2004/1157).
- Programa del Ministerio de Economía y Competitividad, grant nº AGL2012-35708.
- Proyecto nº P06-CVI-02186 y BIO298 de la Junta de Andalucía.
- Plan Propio de la Universidad de Sevilla.

En el periodo del 2004-2007, la doctoranda estuvo contratada como Profesora de Universidad Asimilada a Asociado en situación de interinidad, en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología.





## ÍNDICE

---

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
1.1. LA REMOLACHA AZUCARERA EN ANDALUCÍA: LA SIEMBRA OTOÑAL.....	2
1.2. ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO DE LA REMOLACHA AZUCARERA.....	6
1.2.1. La producción mundial .....	7
1.3. EFECTO DE LOS FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE EL CULTIVO DE LA REMOLACHA AZUCARERA. MECANISMOS QUE DETERMINAN EL NIVEL DE TOLERANCIA Y ACLIMATACIÓN. ....	10
1.3.1. Rutas de señalización activadas en respuesta a estrés abiótico .....	10
1.3.2. El déficit hídrico reduce el crecimiento .....	11
1.3.3. Las plantas realizan ajuste osmótico en suelos secos por la acumulación de solutos .....	13
1.3.4. Déficit hídrico y metabolismo del carbono .....	15
1.3.5. El estrés por temperatura afecta a un amplio espectro de procesos fisiológicos .....	16
1.3.6. Alteraciones morfológicas en respuesta al estrés abiótico .....	18
1.3.7. Estrés por altas temperaturas y estrés por déficit hídrico: efectos sumativos .....	19
1.4. RIQUEZA DE LA RAÍZ: METABOLISMO DE LA SACAROSA.....	22
1.4.1. La Sacarosa Sintasa (SS): Un marcador de la fuerza de los sumideros en los cultivos. ....	25
1.4.2. Actividades Invertasa (IA,IN).....	28
1.5. ESTADO METABÓLICO DE LA RAÍZ: FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXILASA (PEPC) Y ADENOSÍN FOSFATOS .....	33
1.5.1. Funciones de la PEPC .....	34
1.5.2. Regulación de la actividad PEPC.....	35
1.5.3. PEPC y temperatura .....	39
1.5.4. Metabolismo y niveles de nucleótidos de adenina .....	39
1.6. OBJETIVOS .....	41
 <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
2.1. CONDICIONES DE CULTIVO EN LOS ENSAYOS DE CAMPO.....	43
2.1.1. Material vegetal y condiciones de manejo .....	43
2.1.2. Descripción del diseño de muestreo básico.....	43
2.1.3. Diseño de los ensayos de campo realizados en cada campaña (2004-2005, 2005-2006, 2006-2007) .....	43
2.1.3.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña) .....	44

2.1.3.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña) .....	45
2.1.3.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña) .....	49
2.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS .....	52
2.3. TOMA DE MUESTRAS, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN .....	53
2.4. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS .....	55
2.5. TRATAMIENTOS SUMINISTRADOS A LAS PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO .....	55
2.6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS .....	57
2.6.1. Determinación de proteínas solubles. ....	57
2.6.2. Determinación de la glucosa .....	57
2.6.3. Determinación de la concentración de prolina .....	57
2.6.4. Determinación de la cantidad de adenilatos .....	58
2.6.5. Contenido hídrico y contenido hídrico relativo .....	58
2.7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS .....	59
2.7.1. Extracción de las enzimas .....	59
2.7.2. Determinación de la actividad enzimática .....	59
2.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	62
2.8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) ....	62
2.8.2. Tinción con azul de Coomassie y secado de geles .....	62
2.9. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS .....	63
2.9.1. Tipos de anticuerpos utilizados en este trabajo .....	63
2.9.2. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos (western blot) .....	63
2.10. PARÁMETROS AGRONÓMICOS .....	64
2.10.1. Determinación del Brix .....	64
2.10.2. Materia seca .....	64
2.10.3. Polarización o sacarimetría .....	64
2.10.4. Elementos melacígenos .....	64
2.10.5. LAI: Índice de Área Foliar .....	65
2.10.6. Producción de biomasa: raíz y hojas .....	65
2.10.7. Producción de sacarosa (Az/Ha) .....	65
2.10.8. Superficie foliar específica (SFE) .....	65
2.11. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA .....	66
2.12. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	67
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
3.1. LOS EFECTOS DEL TÚNEL Y LOS PARÁMETROS AGRONÓMICOS .....	69

3.1.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña).....	70
3.1.1.1. <i>Los túneles produjeron efectos limitados en la temperatura, la humedad y la luz.</i> .....	70
3.1.1.2. <i>Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos</i> .....	72
3.1.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña).....	77
3.1.2.1. <i>Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos</i> .....	79
3.1.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña).....	84
3.1.3.1. <i>Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos</i> .....	85
3.1.4. Comparación de los parámetros agronómicos entre las tres campañas .....	90
3.1.4.1. <i>Comparación de los datos climáticos del ensayo térmico a lo largo de las tres campañas.</i> .....	90
3.1.5. Correlaciones encontradas en los ensayos de túneles a lo largo de las tres campañas entre los parámetros climáticos y agronómicos. ....	93
3.1.6. Correlaciones encontradas en los ensayos entre los parámetros climáticos y agronómicos de las tres campañas analizadas conjuntamente.....	97
3.1.6.1. <i>La temperatura</i> .....	97
3.1.6.2. <i>La ETo: una medida de la demanda hídrica</i> .....	97
3.1.6.3. <i>Integral térmica: Una medida del desarrollo del cultivo</i> .....	98
3.1.6.4. <i>LAI: Una medida del desarrollo foliar</i> .....	100
3.2. EVOLUCIÓN DE LA GLUCOSA, LA CANTIDAD DE PROTEÍNA Y LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE SACAROSA: SACAROSA SINTASA, INVERTASA NEUTRA E INVERTASA ÁCIDA EN EL ENSAYO TÉRMICO CON TÚNELES. ANÁLISIS DE LAS CORRELACIONES DE ESTAS ENZIMAS .....	109
3.2.1. <b>Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña)</b> .....	109
3.2.1.1. <i>Concentración de glucosa en la raíz</i> .....	109
3.2.1.2. <i>Cantidad de proteína</i> .....	110
3.2.1.3. <i>Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la primera campaña (2003-2004)</i> .....	111
3.2.1.3.1. <i>Evolución de la actividad Sacarosa Sintasa (SS)</i> .....	112
3.2.1.3.2. <i>Correlaciones de la actividad SS durante la primera campaña (2003-2004)</i> .....	114
3.2.1.3.3. <i>Evolución de la actividad Invertasa Neutra (IN)</i> .....	115
3.2.1.3.4. <i>Correlaciones de la actividad IN durante la primera campaña (2003-2004)</i> .....	116
3.2.1.3.5. <i>Evolución de la actividad Invertasa Ácida (IA)</i> .....	117
3.2.1.4. <i>Comparación de las tres actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa</i> .....	118
3.2.2. <b>Campaña agrícola 2004-2005 (ª campaña)</b> .....	119
3.2.2.1. <i>Concentración de glucosa en la raíz en la 2ª campaña</i> .....	119

3.2.2.2.	<i>Cantidad de proteína en la raíz</i> .....	120
3.2.2.3.	<i>Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la segunda campaña (2004-2005)</i> .....	121
3.2.2.3.1.	<i>Evolución de la actividad Sacarosa Sintasa (SS)</i> .....	122
3.2.2.3.2.	<i>Correlaciones de la actividad SS durante la segunda campaña (2004-2005)</i> .....	122
3.2.2.3.3.	<i>Evolución de la actividad Invertasa Neutra (IN)</i> .....	123
3.2.2.3.4.	<i>Correlaciones de la actividad IN durante la segunda campaña (2004-2005)</i> .....	124
3.2.2.3.5.	<i>Evolución de la actividad Invertasa Ácida (IA)</i> .....	125
3.2.2.4.	<i>Comparación de las tres actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa durante la segunda campaña (2004-2005)</i> .....	125
3.2.3.	<b>Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña)</b> .....	129
3.2.3.1.	<i>Concentración de glucosa en la raíz</i> .....	129
3.2.3.2.	<i>Cantidad de proteína en la raíz</i> .....	130
3.2.3.3.	<i>Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la tercera campaña (2005-2006)</i> .....	131
3.2.3.3.1.	<i>Evolución de la actividad SS</i> .....	131
3.2.3.3.2.	<i>Correlaciones de la actividad SS durante la tercera campaña (2005-2006)</i> .....	132
3.2.3.3.3.	<i>Evolución de la actividad invertasa neutra</i> .....	133
3.2.3.3.4.	<i>Correlaciones de la actividad IN durante la tercera campaña (2005-2006)</i> .....	133
3.2.3.3.5.	<i>Evolución de la actividad invertasa ácida</i> .....	134
3.2.4.	<b>Patrones y evolución de las actividades de degradación de la sacarosa en las tres campañas estudiadas</b> .....	136
3.2.4.1.	<i>SS: movilizandoreservas para el desarrollo fenológico</i> .....	137
3.2.4.2.	<i>Invertasa Neutra</i> .....	139
3.2.4.3.	<i>Invertasa ácida</i> .....	139
3.3.	<b>ADENILATOS COMO ÍNDICE DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE LA RAÍZ DE LA REMOLACHA</b> .....	140
3.3.1.	<b>1ª Campaña (2003-2004)</b> .....	140
3.3.2.	<b>2ª Campaña (2004-2005)</b> .....	143
3.3.2.1.	<i>Evolución de la cantidad de adenilatos en el ensayo hídrico</i> .....	145
3.3.3.	<i>Correlaciones de los distintos parámetros estudiados con los adenilatos de la raíz</i> .....	148
3.4.	<b>ESTRÉS TÉRMICO VERSUS HÍDRICOS</b> .....	149
3.4.1.	<b>Prolina durante la campaña 2003-2004 (1ª campaña)</b> .....	149
3.4.1.1.	<i>Correlaciones de la prolina durante la primera campaña</i> .....	151
3.4.2.	<b>Prolina durante la campaña 2004-2005 (2ª campaña)</b> .....	152

3.4.3. Prolina en la campaña 2005-2006 (3ª campaña) .....	157
3.4.3.1. <i>Contenido hídrico de la remolacha en las tres condiciones estudiadas</i> .....	159
3.4.3.2. <i>Correlación entre los niveles de prolina y datos agronómicos durante la tercera campaña</i> .....	161
3.4.4. Ensayos en condiciones controladas .....	164
3.4.5. Análisis de las correlaciones que presenta la prolina con el resto de parámetros estudiados	170
3.5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC).....	171
3.5.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña).....	172
3.5.1.1. <i>Evolución de la actividad PEPC durante la 1ª campaña</i> .....	172
3.5.1.2. <i>Niveles de activación de la PEPC durante la 1ª campaña</i> .....	174
3.5.1.3. <i>Medidas de la PEPC en hojas durante la primera campaña</i> .....	178
3.5.1.4. <i>Patrones de monoubiquitinación de la PEPC en hojas y raíces durante la 1ª campaña</i> ..	179
3.5.1.5. <i>Correlaciones de la actividad PEPC con el resto de parámetros estudiados durante la 1ª campaña</i> .....	181
3.5.1.6. <i>Correlaciones entre los parámetros indicadores de la regulación de la PEPC por fosforilación durante la 1ª campaña</i> .....	183
3.5.1.7. <i>Correlaciones entre la fosforilación de la PEPC y los demás parámetros estudiados durante la 1ª campaña</i> .....	185
3.5.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña).....	188
3.5.2.1. <i>Evolución de la actividad PEPC</i> .....	188
3.5.2.2. <i>Niveles de fosforilación de la PEPC: de activación de la PEPC durante la 2ª campaña</i> ..	189
3.5.2.3. <i>Estado de monoubiquitinación de la PEPC</i> .....	192
3.5.2.4. <i>Correlaciones con la actividad PEPC con el resto de parámetros estudiados durante la 2ª campaña</i> .....	192
3.5.2.5. <i>Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de fosforilación de la PEPC durante la 2ª campaña</i> .....	194
3.5.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña).....	197
3.5.3.1. <i>Evolución de la actividad PEPC durante la 3ª campaña</i> .....	197
3.5.3.2. <i>Niveles de activación de la PEPC</i> .....	198
3.5.3.3. <i>Correlaciones de la actividad PEPC a pH 8 durante la 3ª campaña</i> .....	201
3.5.3.4. <i>Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de fosforilación de la PEPC durante la 3ª campaña</i> .....	202
3.5.4. El efecto de la temperatura in vitro sobre la actividad PEPC.....	204
3.5.5. Patrones y evolución de la actividad PEPC a lo largo de las tres campañas.....	208
3.5.6. Correlaciones globales de la actividad PEPC a pH8: relaciones con todos los parámetros estudiados en todos los ensayos de campo .....	210

3.6. MICROTÚNELES: INFLUENCIA DEL ESTADO DE DESARROLLO EN LA RESPUESTA AL GOLPE DE CALOR .....	213
3.6.1. Resultados del ensayo de microtúneles durante la segunda campaña (2004-2005) .....	213
3.6.2. Resultados del ensayo de microtúneles durante la tercera campaña (2005-2006) .....	220
3.6.2.1. <i>Parámetros agronómicos estudiados en los ensayos de microtúneles</i> .....	222
3.6.2.2. <i>Parámetros fisiológicos estudiados en los ensayos de microtúneles de la tercera campaña</i> .....	225
3.6.2.3. <i>Actividades enzimáticas en el ensayo de microtúneles en la 3ª campaña</i> .....	228
3.6.2.4. <i>Niveles de prolina en el ensayo de microtúneles en la 3ª campaña</i> .....	230
3.6.2.5. <i>Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en los ensayos de microtúneles en la 3ª campaña</i> .....	230
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>239</b>
4.1. Los efectos del túnel y los parámetros agronómicos.....	240
4.2. Evolución de la cantidad de glucosa, de proteínas y de las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la sacarosa.....	244
4.3. Estrés térmico vs estrés hídrico: Prolina y parámetros hídricos.....	248
4.4. Influencia del estado de desarrollo en la respuesta al golpe de calor: microtúneles .....	251
4.5. La actividad PEPC y el estado metabólico de la raíz .....	252
4.6. Los adenilatos como índice de la actividad metabólica de la raíz.....	261
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>264</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>267</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS</b>	

## ABREVIATURAS

---

Las abreviaturas utilizadas en este trabajo se especifican a continuación. Para los nombres y símbolos utilizados, se ha elegido el sistema Internacional de Unidades. Las sustancias químicas se han nominado según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

ADP	Adenosín difosfato
Adenilatos-ATP/ADP	Relación entre el contenido de ATP y de ADP
ATP	Adenosín trifosfato
Az/Ha	Sacarosa obtenida por Ha
BRIX	Brix de la raíz
C <sub>3</sub>	Especie cuyo primer producto fotosintético estable posee 3 átomos de carbono
C <sub>4</sub>	Especie cuyo primer producto fotosintético estable posee 4 átomos de carbono
DMDP	2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxipirrolidina, inhibidor de la actividad invertasa.
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ETo	Evapotranspiración potencial
EToC	Evapotranspiración potencial calculada
EToC2d	Evapotranspiración potencial calculada en los 2 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
EToC4d	Evapotranspiración potencial calculada en los 4 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
EToC6d	Evapotranspiración potencial calculada en los 6 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
G6P	glucosa 6 fosfato
GDIA	Grados-día. Integral térmica
GDIA2d	Grados día en los 2 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
GDIA4d	Grados día en los 4 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
GDIA6d	Grados día en los 6 últimos días (suma, incluyendo el día actual)
Hojas/Pl	Hojas por planta

IA	Invertasa ácida
IA –U/gpf	Actividad total IA
IA –U/mg prot	Actividad específica IA
IN	Invertasa neutra
IN –U/gpf	Actividad total IN
IN –U/mg prot	Actividad específica IN
LAI	Índice de área foliar
MS	Materia seca
MDH	Malato deshidrogenasa
N- $\alpha$ -amino	Nitrógeno alfa amino en la raíz
NNJUP	Nitrógeno nítrico en jugo de peciolo
NNMSP	Nitrógeno nítrico en materia seca de planta
NTL	Nitrógeno total limbo
NTP	Nitrógeno total planta
NTR	Nitrógeno total raíz
OAA	Oxalacetato
PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida
PBrix	Brix del peciolo
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PEPC	Fosfoenopiruvato carboxilasa
PEPC-pH7,1-U/mgprot	Actividad específica de la PEPC medida a pH 7,1
PEPC-pH7,3-U/mgprot	Actividad específica de la PEPC medida a pH 7,3
PEPC-pH8-U/mgprot	Actividad específica de la PEPC medida a pH 8
PEPC-pH7,3- ActivacionG6P	Relación entre la actividad PEPC a pH 7,3 en presencia de 4mM de G6P y la actividad PEPC a pH 7,3 sin G6P
PEPC-pH7,1- ActivacionG6P	Relación entre la actividad PEPC a pH 7,1 en presencia de 4mM de G6P y la actividad PEPC a pH 7,1 sin G6P



PEPC-pH8/pH7,3	Relación entre la actividad PEPC a pH 8 y la actividad PEPC a pH 7,3
PEPC-pH8/pH7,1	Relación entre la actividad PEPC a pH 8 y la actividad PEPC a pH 7,1
PEPC-SIN-02mM-Ugpf	Actividad total PEPC medida a pH7,3 en presencia de 0,2 mM malato. Las concentraciones que pueden aparecer son: 002mM=0,02 mM; 005mM=0,05 mM; 05mM=0,5 mM; 1mM=1 mM.
PEPC-SIN-02mM-Inhibición	% de inhibición de la actividad PEPC medida a pH 7,3 en presencia de 0,2 mM de malato. Las concentraciones que pueden aparecer son: 002mM=0,02 mM; 005mM=0,05 mM; 05mM=0,5 mM; 1mM=1 mM.
PEPC-50°-ACTTm	% de actividad PEPC respecto a la máxima actividad, que se mantiene a pH 8 y 50°C in vitro
PEPC-SIN-50°-Ugpf	Actividad total PEPC a pH 8 y 50°C in vitro
PEPC-SIN-50°-Umgprot	Actividad específica PEPC a pH 8 y 50°C in vitro
PF	Peso fresco
Pi	Fosforo inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PORMSH	% de materia seca de la hoja
PORMSL	% de materia seca del limbo
PORMSP	% de materia seca de la planta
ProdMSR	Producción de materia seca de raíz
Prod	Producción
ProdR	Producción de raíz
Prolina- raíz-Ugpf	Prolina en la raíz por peso fresco
Prolina- hoja-Ugpf	Prolina en la hoja por peso fresco
Prolina- peciolo-Ugpf	Prolina en el peciolo por peso fresco
Prolina U/gpf	µmoles de prolina por gramo de peso fresco
PROMSH	Producción materia seca de hoja
PROMSL	Producción materia seca de limbo
PROMSP	Producción materia seca de planta

PROMSR	Producción materia seca de raíz
PS	Peso seco
RAAmino	Nitrógeno alfa amino en la raíz
RAzRed	Azúcares reductores en la raíz
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPol	Polarización de la raíz
RPotasio	Potasio en la raíz
RSodio	Sodio en la raíz
Rubisco	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS
SFE	Superficie foliar específica
SFEMS	Superficie foliar específica por gramo de materia seca
SS	Sacarosa sintasa
SS-U/gpf	Actividad total SS
SS-U/mgprot	Actividad específica SS
T <sup>a</sup>	Temperatura
TBS	Tampón tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina
TGM	Tris-HCl 48 mM, glicina 38 mM, SDS 0,037% (p/v), metanol 5%
TMEDIA	Temperatura media
TMIN	Temperatura mínima
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Ub	Ubiquitina



## **RESUMEN**



La remolacha azucarera, *Beta vulgaris*, es una de las pocas especies de plantas superiores que utilizan la sacarosa como molécula de reserva de carbono a largo plazo. Es la principal fuente de producción de sacarosa en Europa. En Andalucía ha sido posible el gran desarrollo de este cultivo gracias a la gestión de la planta en un ciclo distinto al resto de España: la siembra otoñal. Andalucía produce prácticamente la totalidad de la remolacha de recolección estival de España. A pesar de los grandes avances en producción integrada de este cultivo, siguen siendo necesarias mejoras agrícolas y ecológicas que le permitan prosperar en las actuales condiciones de la política económica europea.

La temperatura es una variable con gran influencia sobre el cultivo. Datos de anteriores campañas mostraban pérdidas muy significativas de concentración de sacarosa y de calidad industrial, que habían coincidido con golpes de calor en el mes en el que comienza la ganancia de riqueza (mayo). Esto, junto con la rápida evolución del cambio climático y las consecuencias que se predicen en Andalucía, justifican la importancia de ahondar en el estudio del comportamiento agronómico y metabólico de este importante cultivo frente a las altas temperaturas.

En este trabajo se ha analizado la repercusión de los golpes de calor (aumentos bruscos de  $T^a$ , frecuentes en la primavera y el verano andaluz) en la producción, la calidad y el metabolismo, de la raíz de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Para ello se han realizado ensayos de campo en parcelas en producción, durante tres campañas agronómicas. Se han generado datos ante el estrés térmico, hídrico y combinado, con la utilización de túneles plásticos y variando las condiciones hídricas. Se ha estudiado la respuesta de las plantas al déficit hídrico, térmico y combinado en condiciones controladas en cámaras de cultivos e invernadero con diversos sustratos. Han sido medidos y valorados parámetros agronómicos relacionados con el crecimiento, la producción y el estado hídrico de la planta, indicadores del estado hídrico y osmolitos compatibles. También se han registrado las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa, sacarosa sintasa (SS), invertasa ácida (IA) e invertasa neutra (IN). Además, se ha cuantificado la acumulación de adenilatos, la actividad fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) y su regulación por fosforilación o monoubiquitinación en las condiciones estudiadas para profundizar en los procesos metabólicos de este sumidero.

Este estudio ha puesto de manifiesto que tanto el estrés hídrico como el térmico disminuyen la superficie fotosintéticamente activa de la planta, limitando el crecimiento de la raíz pero no la concentración de sacarosa y que el efecto del golpe de calor sólo afecta a la calidad de la raíz cuando va acompañado de déficit hídrico. También ha puesto de manifiesto que el estrés térmico tiene mayor impacto en los parámetros agronómicos cuanto más temprano ocurra el episodio. Las medidas enzimáticas de la SS, la IN y la PEPC han puesto de relevancia su papel en el crecimiento de la raíz, pudiendo aumentar su actividad en situaciones de estrés cuando estas se producen en la fase de crecimiento. La SS y la IN aumentan su actividad en situaciones que requieran movilización de reservas para reponer el aparato fotosintético. Aquí también se demuestra que la PEPC es activada por fosforilación en situaciones de estrés hídrico y que el estrés térmico de la planta genera cambios

en la enzima que la hacen más resistente a altas temperaturas *in vitro*. Además, se ha puesto por primera vez en evidencia, la existencia de regulación por monoubiquitinación en hojas y raíces de *Beta vulgaris*.

Los resultados de estos estudios han permitido diferenciar patrones de respuesta de la remolacha azucarera al estrés térmico, hídrico o combinado. También han permitido concluir la importancia de una buena programación de riegos en el momento de crecimiento del cultivo que tome como referencia los parámetros de la planta y no sólo los climáticos. Esto permitiría adelantarse a las consecuencias de la importante pérdida de biomasa de raíz producidas por ambas presiones ambientales combinadas, mejorando así la eficacia del cultivo.



## **1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**





## 1.1. LA REMOLACHA AZUCARERA EN ANDALUCÍA: LA SIEMBRA OTOÑAL

---

La remolacha es una de las pocas especies de plantas superiores que utilizan la sacarosa como molécula para almacenar el exceso de carbono a largo plazo. *Beta vulgaris* es una dicotiledónea bianual de la familia Chenopodiaceae. En el primer año completa su ciclo vegetativo formándose una roseta de hojas y una raíz tuberizada. La raíz pivotante es el órgano responsable de la acumulación de azúcar. El segundo año se produce el alargamiento del tallo y la floración (espigado), completándose el ciclo reproductivo con la formación de la semilla (Villarías Moradillo 1999a; Villarias Moradillo 1999b). En las hojas se produce la síntesis de la sacarosa. Cualquier práctica cultural, agente atmosférico o patológico que deteriore las hojas, traerá como consecuencia una disminución de la cosecha. Es admitida la existencia de una correlación positiva entre el vigor del follaje y el contenido en azúcar (Villarías Moradillo 1999a; Villarias Moradillo 1999b).

En la mayoría de los cultivos de remolacha, en las zonas más frías del Norte de Europa, de España y en Rusia, se lleva a cabo la **siembra primaveral**. Se siembra a principios de primavera, cuando finaliza el riesgo de heladas, y se recoge a finales de septiembre-octubre. El cultivo se desarrolla a temperaturas favorables y constantes, las cosechas tienen una duración de 6-7 meses y las plantas no suelen pasar periodos fríos (vernalización) lo que reduce el riesgo de espigado. El manejo del cultivo se encuentra bien establecido y se conoce bien la fisiología de la remolacha de siembra primaveral (John 1992). Pero es escasa la información sobre la de siembra de otoño.

La **siembra otoñal** se lleva a cabo en una estrecha franja del mundo, del paralelo 40° N al trópico de Cáncer, donde la siembra primaveral no es posible. En esta forma de manejo del cultivo de la remolacha, la siembra se lleva a cabo en los meses de octubre-noviembre y se recoge a finales de julio. Con esto se consigue evitarle a las plántulas en pleno crecimiento la exposición a las altas temperaturas del verano. Esta práctica ha permitido el desarrollo del cultivo en Andalucía, donde se da la mayor superficie con este tipo de manejo de todo el mundo. Actualmente se cultivan en Andalucía unas 8.662 Has de remolacha azucarera en modalidad del cultivo de siembra de otoño con recolección en verano para producir un total de 749.502 t de raíz (MAGRAMA 2015). En el 2005 los datos en Andalucía eran de 42.000 Has y 2,4 millones de t. (AMI 2002). La extensión de cultivo en Andalucía se ha visto reducida a una 5ª parte, mientras que la producción sólo se ha reducido 3 veces. Esto indica importantes mejoras en la productividad del cultivo.

Tradicionalmente, esta forma peculiar de manejo llevaba consigo una serie de problemas:

i) unas condiciones ambientales muy variables, ya que el cultivo se desarrolla entre otoño, invierno y verano,

ii) la vernalización, que puede producirse en las zonas más frías de Andalucía provocando el espigado,

iii) un periodo de cultivo más largo (9 meses) para obtener la misma producción que en el norte,

iv) la pérdida de producción que provocan las altas temperaturas de verano previas a la recolección,

v) una práctica de abonado nitrogenado errática debido a las condiciones climáticas cambiantes (exceso de lluvia o sequía) que dificulta el ajuste de los mínimos necesarios para un buen desarrollo del cultivo.

Existen numerosas referencias relativas a que la calidad industrial de la remolacha de siembra otoñal es inferior a la primaveral, produciéndose pérdidas en el peso final de azúcar obtenida, aun partiendo de los mismos grados de polarización del cultivo (16° polarimétricos rinden 136,3 kg/t remolacha zona norte, y 122,4 kg/t remolacha zona sur, (Morillo-Velarde et al. 2001).

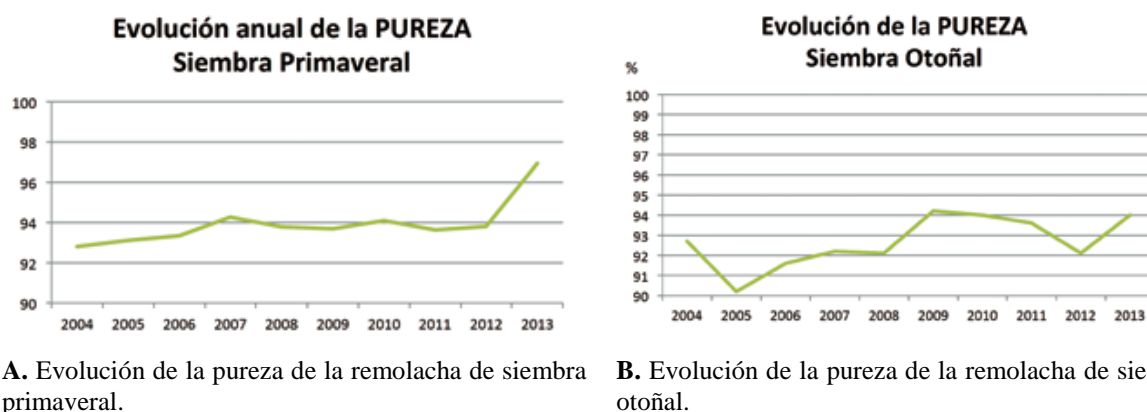
La Polarización o “riqueza” de la remolacha, permite hacer una estimación del azúcar o sacarosa potencialmente extraíble de la raíz. No todo el azúcar indicado por la polarización se puede transformar en azúcar consumible. Parte de este azúcar se va a “perder” durante la extracción industrial. Parte de esta sacarosa queda retenida en las melazas, co-producto de la extracción de la sacarosa, debido a determinados componentes de la raíz de remolacha, que se conocen como “elementos melacígenos”. Los más importantes son los azúcares reductores (glucosa y fructosa), los iones alcalinos (sodio, potasio) y aminoácidos y amidas (nitrógeno alfa-amino), que aumentan la solubilidad de la sacarosa en los jarabes finales y producen coloraciones en el azúcar que dañan la calidad del producto final (Gordo 2003). Cuanto más elevados son estos valores en la raíz de remolacha, mayores son las pérdidas de azúcar en el proceso de extracción (Gutierrez Sosa 2015). La calidad de la remolacha azucarera depende tanto de factores manejables por el agricultor (agronómicos) como no manejables (suelo, clima) (Fig.I.1).



**Figura I.1.** Factores manejables y no manejables por los agricultores, que determinan la calidad industrial de la remolacha azucarera. Fuente: Revista AIMCRA, mayo 2015.

El clima es un factor no manejable. La incidencia de este factor sobre la Calidad Tecnológica de la raíz de remolacha es muy importante. Algunos autores estiman que el 30% de la variación porcentual de la Calidad Tecnológica en siembra de primavera y el 60% en siembra de otoño (por la presencia del cultivo de secano) están afectada por el clima (Gordo 2003). Por regla general, los años de sequía afectan desfavorablemente a la Calidad Tecnológica, provocando estrés hídrico en la remolacha así como una alteración de los componentes químicos de la raíz (especialmente en los compuestos con nitrógeno  $\alpha$ -amino) que en definitiva supone una reducción de la Calidad (Moro 1992). Estudios llevados a cabo para detectar la influencia de las variedades de remolacha cultivada en Europa y las condiciones ambientales, han concluido que para todos los parámetros de rendimiento y de calidad, el efecto del medio ambiente represento alrededor del 80% de la varianza total (Hoffmann et al. 2009)

En las figuras I.2 A y B se presenta la evolución de la pureza de las últimas diez campañas azucareras en la Siembra de Primavera y Siembra de Otoño. En ambos casos, la línea de tendencia es ligeramente ascendente. En la siembra otoñal es más inestable debido fundamentalmente al efecto que ejerce el clima y muy marcadamente en el cultivo de secano sobre la calidad industrial (Gutierrez Sosa 2015).



**Figura I.2.** Evolución de la pureza (calidad industrial) en el cultivo de las remolachas de siembra otoñal y primaveral en España durante las campañas 2004-2013. Fuente: publicación AIMCRA 2014.

Continuamente se están evaluando nuevas variedades, se realizan estudios sobre el uso adecuado del abono según el tipo de suelo, tiempos de espera para la recolección, reguladores de crecimiento y condiciones de riego. Los resultados de estas investigaciones generan un conjunto de recomendaciones específicas.

En el cultivo de la remolacha en España, los rendimientos han aumentado de forma continua y especialmente en los últimos años, como no lo ha hecho ningún otro cultivo, como consecuencia del conocimiento técnico desarrollado y de su transferencia eficaz a los agricultores. Actualmente los rendimientos medios de la siembra de primavera (105 t/ha equivalentes a 16,8 t/ha de sacarosa; 6,25 t de raíz/t sacarosa) y de la siembra de otoño (81 t/ha equivalentes a 12,9 t/ha de sacarosa; 6,28 t de

raíz/t sacarosa) en España, son los más altos del mundo en cada modalidad de cultivo. Prácticamente la totalidad del cultivo de siembra de otoño se hace en producción integrada (lo que supone la existencia de un protocolo oficial de normas de cultivo y de un grupo de técnicos que hacen un asesoramiento personalizado a los agricultores) (Morillo-Velarde 2012). El cultivo de la remolacha otoñal ha ido mejorando desde los años 80 con una media de mejora anual del rendimiento del 1.4 % (Morillo-Velarde 2014).

La entrada en vigor de la nueva PAC para el periodo 2015- 2020 incluye, dentro del apartado de las ayudas asociadas al cultivo, el compromiso obligatorio para la remolacha de cumplir con el reglamento de Producción Integrada (PI) (Bermejo Corrales 2015).

La temperatura es una variable con gran influencia sobre el cultivo. Es conocida la importancia de la temperatura en los primeros momentos del desarrollo, su influencia en la entrada en vernalización, y en la producción del espigado (floración). También se ha incluido en los modelos de predicción de aparición de ciertas plagas (esencialmente pulgones). El análisis de las campañas de 1995, 1996 o 2003 mostró una pérdida muy significativa de riqueza y una importante merma en la calidad industrial. Estas campañas tuvieron en común episodios de golpes de calor durante el periodo en que comienza la ganancia de riqueza (mes de mayo). Esta pérdida de riqueza y calidad puede ser achacable a las altas temperaturas alcanzadas en momentos críticos del cultivo (Memoria proyecto Profit 2003).

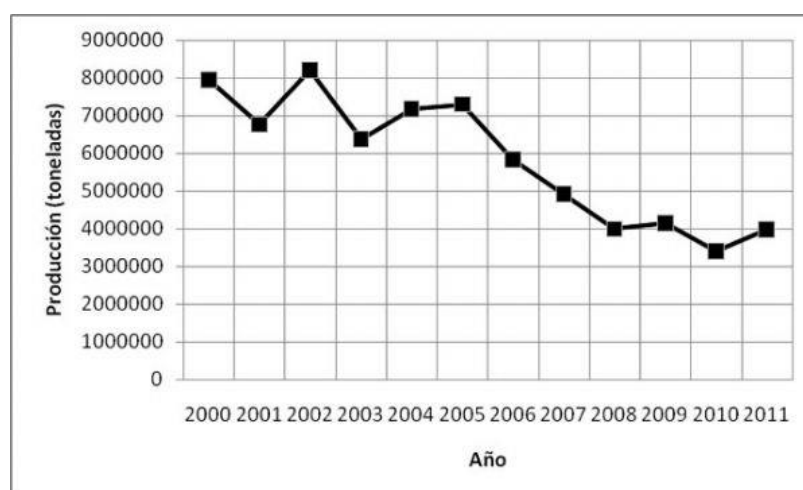
Durante la campaña 2014-2015, a pesar de los buenos resultados y la mejora en el cultivo se reseña desde AIMCRA que “las altas temperaturas que se han padecido a lo largo del mes de julio han tenido una elevada incidencia en el cultivo, afectando tanto a la polarización como a la calidad tecnológica de la remolacha” (Campaña remolachera-azucarera 2014/2015, AIMCRA). Es limitado el conocimiento sobre la influencia de las variables climáticas en la calidad de la remolacha. Esto hace importante el conocimiento del efecto de las altas temperaturas en periodos críticos del cultivo, que permitirían hacer propuestas de manejo que palien el efecto de las mismas, haciendo la remolacha más rentable y competitiva.

La reducción de las cuotas de mercado y la nueva normativa europea, han obligado al sector remolachero a aumentar la eficacia. La Producción Integrada de la remolacha azucarera en Andalucía ha permitido conocer con detalle las prácticas de cultivo realizadas por los agricultores. Junto con las recomendaciones de cultivo, los planes de producción integrada, han permitido mantener la rentabilidad del cultivo para los cultivadores de remolacha, mejorar los rendimientos, reducir los costes y al mismo tiempo cumplir con los compromisos de sostenibilidad medioambiental y de seguridad alimentaria (Rosique 2015).

Este proyecto de investigación intenta ahondar en los mecanismos fisiológicos que subyacen en la pérdida de la calidad de las remolachas de siembra otoñal, además de dilucidar qué efectos tienen la temperatura en el cultivo y su relación con el déficit hídrico.

## 1.2. ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO DE LA REMOLACHA AZUCARERA

El cultivo de la remolacha azucarera en España se ha visto obligado a disminuir y reconvertirse. En enero del 2004, la OCM (Organización Común de Mercados) hace una propuesta de reforma del sector del azúcar. Esta reforma estuvo encaminada a llevar a la mitad la producción de azúcar. Los aspectos más negativos para el sector español fueron la disminución de la cuota, la reducción de los precios, la posibilidad de que se produjeran transferencias de cuota entre los Estados miembros y el agrupamiento de las cuotas A, B (precio de la producción contratada previamente) y C (remolacha excedentaria). Estas propuestas supusieron importantes movilizaciones del sector. Hasta ahora, la única salida que le ha quedado al sector remolachero-azucarero es aumentar la eficacia del cultivo. Actualmente la producción de azúcar está limitada por el establecimiento de cuotas a los Estados Miembros de la Unión Europea. La producción se ha venido reduciendo como consecuencia de la reestructuración del sector establecida por la normativa europea (Fig.I.3) (Infoagro 2012).



**Figura I.3.** Evolución de la producción Española de remolacha desde el 2000-2011. Fuente: Revista Infoagro, 2012.

Dentro de la UE, la producción de azúcar española representa el 2,9%, con un porcentaje de cuota de producción del 3,7% y la superficie de remolacha en España supone el 3,5% de la superficie del total de la UE (1,512 millón Ha). Los principales países productores son Francia y Alemania con una cuota de 3 Mt y 2,89 Mt respectivamente, seguidos de Polonia con una cuota de 1,4 Mt. España es el octavo país productor de azúcar (MAGRAMA 2015).

Hasta la campaña de comercialización 2016/17 (30 septiembre 2017) la producción de azúcar está limitada por el establecimiento de cuotas a los Estados miembros de la UE. España tiene asignadas 498.480,2 t de azúcar repartida entre dos empresas, AB Azucarera Iberia, S.L con 378.480,2 t y ACOR con 120.000 t. A partir de la campaña de comercialización actual, 2014/2015 (octubre de 2014 - septiembre de 2015), según permite el Reglamento 1307/2013, se ha decidido que los

remolacheros, en España, reciban una ayuda asociada por hectárea de remolacha cultivada (MAGRAMA 2015).

En el proceso de reestructuración del sector azucarero en la UE, se han dejado de producir 5,77 Mt. El abandono de cuota español supone el 9,97% del total comunitario (MAGRAMA 2015).

Actualmente el cultivo está respaldado por el nuevo AMI (Acuerdo Marco Interprofesional) que aporta un marco de estabilidad para los próximos cinco años y por un modelo que garantice la sostenibilidad del cultivo valorando el rendimiento por hectárea, la calidad tecnológica y el transporte hasta la fábrica. La sostenibilidad presente y futura del sector remolachero azucarero en España depende del incremento de la productividad en el campo y de la mejora de los procesos de extracción en los centros productivos (Agrodigital 2015).

En España, el valor de la producción de la remolacha azucarera representa en 2013 el 0,32% de la Producción de la Rama Vegetal (PRV) y el 0,19% de la Producción de la Rama Agraria (PRA) (MAGRAMA 2015). En la campaña 2013/14, se han cultivado 26.605 ha, con una producción de 2,135 millones de toneladas (Mt) de remolacha de recolección invernal-Zona Norte y 8.662 ha, con una producción de 749.502 t de remolacha de recolección estival-Zona Sur. Andalucía produce prácticamente la totalidad de la remolacha de recolección estival de España. Destaca Sevilla con 5.739 ha / 531.154 t y Cádiz con 2.795 ha / 210.550 t de recolección estival (MAGRAMA 2015)

### **1.2.1. La producción mundial**

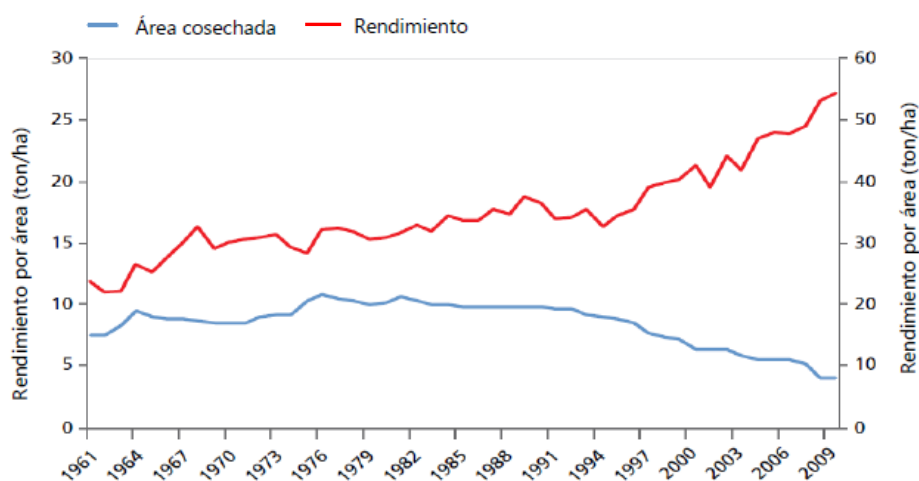
La remolacha azucarera se cosecha en la franja de 60° latitud N y 30° latitud S (FAO 2011, Fig. I.4). La producción mundial de azúcar en 2013 ascendió a 167,3 Mt (Fuente: informe diciembre 2014 de la Organización Internacional del Azúcar, ISO). El principal productor mundial de azúcar en el 2013 fue Brasil con 37,5 Mt, seguido de India con 23 Mt, la UE con 15,9 Mt, China con 13,1 Mt y Tailandia con 9,8 Mt. Los principales importadores mundiales fueron China con 5,6 Mt, la UE con 4,1 Mt, Indonesia con 3,4 Mt y EE.UU. con 2,9 Mt. El principal exportador fue Brasil con una cuota de exportación de 27,1 Mt (45,6 % del total). En cuanto a las previsiones para la campaña 2014/2015 (fuente: ISO), se estima una producción mundial de 172 Mt y un consumo de 171,5 Mt. (MAGRAMA 2015).

A pesar de que el área cultivada ha ido disminuyendo en las últimas dos décadas, la producción total de la raíz se ha mantenido estable en el mismo período debido a los rendimientos en aumento (Fig. I.5) (Rinaldi & Horemans 2014).



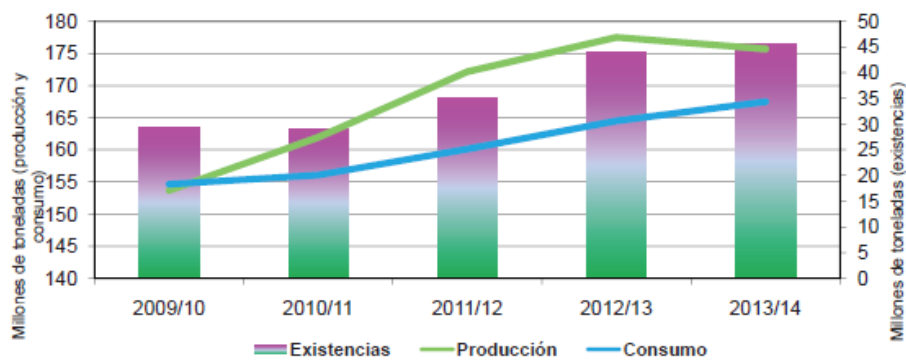
**Figura I.4.** Mapa de la producción mundial de remolacha azucarera. Promedio de la producción desde 1993 hasta 2013. Fuente: FAOSTAT, 2015

En muchos países la remolacha azucarera representa el cultivo que más valor nutritivo produce en relación a la unidad de superficie, pues las hojas y cabezas o topes de la remolacha es un alimento muy rico en nutrientes para el ganado (Infoagro 2012).



**Figura I.5.** Área mundial cosechada de remolacha azucarera y rendimiento promedio durante el periodo 1961-2009. Fuente: FAO, 2011

A nivel mundial, tras varios años de incrementos en la producción (Fig. I.6) en la campaña 2013/14 se redujo la producción mundial de azúcar un 1%, hasta situarse alrededor de 175,7 Mt. El consumo se ha mantenido en alza, incrementándose cerca de un 2% hasta las 167,49 millones de toneladas. Estas cifras indican que la 2013/14 fue la cuarta campaña consecutiva con una producción por encima del consumo (8 mill t de diferencia), por lo que el mercado presentó superávit y unas existencias finales fortalecidas (45,51 mill t, un 3,5% más que en 2012/13).



**Figura I.6.** Evolución del balance mundial del azúcar (2009-2014). Fuente: COAG 2014 con los datos de USDA.

Las nuevas exigencias de productividad y sostenibilidad, requieren de una intensa investigación y transvase de información. Profundizar en la fisiología del cultivo ante condiciones climáticas adversas ayudaría a aportar conocimientos para diseñar estrategias de manejo que permitan aumentar la eficacia. Como por ejemplo, en el caso de la influencia de la temperatura, determinar los periodos críticos del cultivo y asegurar mecanismos de riego en función de los golpes de calor.



### **1.3. EFECTO DE LOS FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE EL CULTIVO DE LA REMOLACHA AZUCARERA. MECANISMOS QUE DETERMINAN EL NIVEL DE TOLERANCIA Y ACLIMATACIÓN.**

---

Los cultivos raramente alcanzan su máxima producción potencial debido a las limitaciones impuestas por el ambiente, como el déficit hídrico, las temperaturas adversas o las deficiencias en nutrientes (Kramer & Turner 1980). Las altas temperaturas y déficit hídrico son dos importantes limitaciones ambientales que restringen el crecimiento de plantas y la productividad en muchas áreas del mundo (Boyer 1982; Ciais et al. 2005). En los cultivos mediterráneos las condiciones climáticas que más limitan el crecimiento son el déficit hídrico y las altas temperaturas.

Según las diferentes señales de estrés ambiental, el genoma de las plantas puede dirigir el flujo de energía a diferentes procesos para establecer un nuevo estado de homeostasis relacionado con las condiciones específicas de estrés. La aclimatación permite a las plantas responder a fluctuaciones ambientales. Las plantas utilizan mecanismos de desarrollo y fisiológicos que las protegen del estrés abiótico. Estos mecanismos incluyen la capacidad de acumular metabolitos y proteínas protectoras, regular el crecimiento, la morfogénesis y la fotosíntesis, transporte de membrana, apertura estomática y distribución de los recursos. El efecto de estos cambios es conseguir la homeostasis celular y que el ciclo vital de la planta pueda ser completado bajo las nuevas condiciones ambientales (Taiz et al. 2015).

El estrés produce desacople funcional de las rutas metabólicas que puede dar como resultado la acumulación de compuestos intermedios que podrían ser subproductos tóxicos. La mayoría de estreses abióticos dan como resultado la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS tienen efectos negativos en el crecimiento, desarrollo y producción pero por otro lado activan rutas de señales de transducción que inducen mecanismos de aclimatación que contrarrestan los efectos negativos del estrés (Taiz et al. 2015).

El seguimiento de la respuesta fisiológica de la planta requiere conocer el grado de estrés al que está siendo sometida (Taiz & Zeiger 2006). Se hace necesario utilizar indicadores para detectar el grado de estrés que está sufriendo la planta y que den información sobre los mecanismos fisiológicos que se están desencadenando en la respuesta.

#### **1.3.1. Rutas de señalización activadas en respuesta a estrés abiótico**

Las ROS actúan como mensajeros. La adquisición de aclimatación sistémica esta mediada por una onda de ROS autopropagada. El estrés abiótico aplicado a una parte de la planta puede generar señales que pueden ser transportadas al resto de la planta, iniciando la aclimatación incluso en partes de la planta que no han sido sometidas a estrés. Este proceso se denomina aclimatación sistémica adquirida (SAA). Han sido descritas rápidas respuestas de SAA a diferentes estreses abióticos: calor,

frio, salinidad, y alta intensidad luminosa. En estos casos ha sido demostrada la mediación de una onda autopropagada de producción de ROS, que viaja a una tasa aproximada de 8,4 cm/min y es dependiente de NADPH oxidasas específicas, las RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homolog D), localizada en la membrana plasmática. Las rápidas tasas descubiertas utilizando la luciferasa sugieren que la respuesta al estrés abiótico puede ocurrir a una tasa mucho mayor de lo que se pensaba previamente (Mittler et al. 2011; Suzuki et al. 2013).

### 1.3.2. El déficit hídrico reduce el crecimiento

Muchos cultivos en condiciones ambientales mediterráneas no son regados durante la temporada de crecimiento y a menudo están sujetos a diferentes grados de estrés hídrico que reduce la producción de biomasa (Iannucci et al. 2000). Numerosos cambios fisiológicos y bioquímicos bien conocidos en la actualidad ocurren en una planta sometida a estrés hídrico. El déficit hídrico disminuye la presión de turgencia, aumenta la toxicidad de los iones e inhibe la fotosíntesis. Cuando las células vegetales experimentan déficit hídrico, se produce la deshidratación celular. Esto afecta a muchos procesos fisiológicos básicos (Tabla I.1) (Taiz et al. 2015).

La **remolacha azucarera** consume 500-800 mm de agua durante el período de crecimiento. Los requerimientos hídricos estacionales dependen del clima y las condiciones meteorológicas, de la fecha de siembra y densidad, del riego y del manejo del cultivo (Allen et al. 1998). Las remolachas azucareras son más sensibles a la escasez de humedad en las primeras etapas de crecimiento, pero su pico de consumo de agua llega cuando se alcanza la cobertura del dosel máxima. Se deben mantener los niveles de humedad del suelo por encima de la mitad a un tercio del total de agua disponible para evitar el cierre estomático (Rinaldi & Horemans 2014).

Por lo general hay una relación positiva entre el uso del agua, la producción radicular y el contenido de azúcar. El estrés hídrico reduce el rendimiento, mientras que el riego excesivo cerca de la cosecha reduce la concentración de sacarosa en la raíz e incrementa los costos de procesamiento, lo que reduce los beneficios (Ehlig & LeMert 1979).

La remolacha azucarera es sensible a los déficits hídricos en el momento de la emergencia del cultivo y durante un período de aproximadamente un mes después de la emergencia. Son necesarios riegos frecuentes y ligeros durante este período. Un exceso de riego temprano puede retardar el desarrollo foliar. Los déficits hídricos en medio del período de crecimiento tienden a afectar los rendimientos de azúcar con más fuerza que cuando se presentan en períodos posteriores (Rinaldi & Horemans 2014).

Los déficits hídricos moderados, junto con deficiencias leves de nitrógeno hacia el final del período de crecimiento, reducen el crecimiento de la raíz pero elevan la concentración de sacarosa. En general, el crecimiento de la parte superior hacia el final del período de crecimiento tiende a tener una correlación negativa con la producción de azúcar, aparentemente como resultado de la competencia

por los asimilados entre el crecimiento vegetativo y la raíz acumuladora. Normalmente, la estación de riego termina entre 2 a 4 semanas antes de la cosecha, dependiendo de la capacidad de retención humedad del suelo, para aumentar la concentración de sacarosa de las remolachas. El cultivo no es muy sensible a déficits hídricos moderados, excepto durante la emergencia y el crecimiento inicial. (Rinaldi & Horemans 2014).

Cuando las plantas están bajo estrés hídrico, las hojas de remolacha se vuelven de color verde oscuro, y si el estrés es severo, las hojas no se recuperan a partir del mediodía, marchitándose por la tarde (Hanks et al. 1981).

La remolacha azucarera proviene de la especie tolerante a la sal *Beta maritima* que posee mecanismos especiales para combatir la sequía y es por lo tanto altamente tolerante a este tipo de estrés ambiental (Clarke et al. 1993).

El cultivo es bastante tolerante a la salinidad, con excepción de las primeras etapas de crecimiento después del establecimiento del cultivo (Katerji et al. 1997).

Es conocido que la raíz de remolacha desarrolla un sistema radicular profundo en déficit hídrico; sin embargo, a pesar de esto, la hoja se marchita frecuentemente bajo condiciones de alta demanda evaporativa (Clarke et al. 1993). El cierre estomático está acoplado con una inhibición de la entrada de carbono y del flujo de nutrientes desde las raíces, dando como resultado que eventualmente la fotosíntesis y la producción de carbohidratos se ven reducidos (Dunham & Clarke 1992). El cierre estomático causa el cese de la evapotranspiración el cual hace aumentar la temperatura foliar (Lourtie et al. 1995). En suelos secos, el crecimiento de la raíz se ve mucho menos deprimido que el crecimiento del tallo. Se ha descrito que bajo estrés por sequía, la relación materia seca de raíz de almacenamiento/ materia seca de hojas disminuye (Marschner 1995; Shaw et al. 2002), indicando una repartición diferente de los fotoasimilados.

El estrés por sequía puede afectar a la acumulación de sacarosa en la remolacha azucarera mediante la restricción del desarrollo foliar y el crecimiento de la raíz de almacenamiento. La producción de la remolacha azucarera está marcadamente restringida por el estrés por la sequía y tanto la formación de hojas como la producción de raíz se ven reducidos (Hoffmann et al. 2005). Esta reducción de la producción puede resultar de la restricción del crecimiento de las hojas y la asimilación de CO<sub>2</sub> (Bloch et al. 2006).

Un buen rendimiento de remolacha azucarera de 160 a 200 días es de 40 a 60 t/ha de remolacha fresca. Se han obtenido rendimientos de hasta 100 t/ha o más bajo condiciones muy favorables. La producción total de materia seca varía de menos de 10 t/ha a más de 20 t/ha. El contenido en sacarosa varía principalmente entre 14 y 18 % sobre una base de materia fresca, lo que corresponde a rendimientos de sacarosa de 5 hasta 15 t/ha. (Rinaldi & Horemans 2014).

### 1.3.3. Las plantas realizan ajuste osmótico en suelos secos por la acumulación de solutos

El agua puede moverse a través del continuo suelo-planta-atmósfera si el potencial hídrico decrece a lo largo de esta ruta. El ajuste osmótico es la capacidad de las células de las plantas para acumular solutos y usarlos para disminuir el potencial hídrico celular en los periodos de estrés osmótico. El ajuste se puede hacer de dos formas implicando a la vacuola o al citosol. Las plantas pueden incorporar los solutos del suelo por la raíz o transportarlos hasta ellas desde otras partes de la planta (Taiz et al. 2015).

#### Los niveles de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

Para el ajuste osmótico pueden usarse iones como el  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , que se localizan en la vacuola donde pueden balancearse las cargas negativas con  $\text{Cl}^-$  y ácidos orgánicos (malato, citrato). En el citoplasma pueden acumularse  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y también  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que son esenciales a bajas concentraciones pero a altas concentraciones puede haber efectos negativos en el metabolismo celular. El  $\text{K}^+$  se requiere en mayor cantidad pero también puede dar problemas a altas concentraciones. Los iones se acumulan en la vacuola (Taiz et al. 2015).

En **remolacha azucarera** se ha descrito que el déficit hídrico reduce la concentración de cationes univalentes ( $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ ) en los peciolo y la concentración de los cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) en las hojas maduras y viejas, sin variar el contenido en cationes de la raíz acumuladora (Chołuj et al. 2008). Sin embargo se produce la acumulación de osmolitos compatibles como la prolina o la glicina-betaína (Chołuj et al. 2008).

#### Los solutos compatibles

Al incrementarse los iones en la vacuola deben acumularse otros solutos en el citosol para mantener el equilibrio de potenciales entre compartimentos. Estos solutos se denominan solutos compatibles. Son compuestos orgánicos osmóticamente activos que no desestabilizan las membranas ni interfieren en las reacciones enzimáticas a altas concentraciones, como sí lo hacen los iones. Los más frecuentes son: prolina (aminoácido), sorbitol (azúcar alcohol), glicina-betaína (componente cuaternario del amonio). Pueden usarse grandes cantidades de carbono para sintetizar estos solutos orgánicos, por eso la síntesis de estos componentes tienden a reducir la producción agrícola (Taiz et al. 2015).

La **prolina** es un aminoácido cuyos niveles aumentan en las plantas en diversas situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico (Delauney & Verma 1993). Es especialmente destacable su acumulación en respuesta al déficit hídrico (Hasegawa et al. 1994), que, además, aumenta la tolerancia al estrés hídrico y salino de la planta (Kishor et al. 1995). La prolina además tiene función osmoprotectora protegiendo a las células de subproductos tóxicos y suministrando una fuente de C y N cuando la célula vuelve a la normalidad. Con independencia de su función fisiológica, se considera

que la acumulación de prolina es un buen índice de estrés hídrico (Iannucci et al. 2000; Ain-Lhout et al. 2001). En la remolacha azucarera, la prolina se acumula en las hojas en respuesta a estrés osmótico y salino (Gzik 1996; Chołuj et al. 2008). También se ha descrito la acumulación de prolina en raíces acumuladoras de remolacha en respuesta al estrés por sequía (30% de la capacidad de campo durante 35 días) (Chołuj et al. 2008). En este trabajo se verá que la acumulación de prolina en los diferentes órganos de remolacha depende de la señal (estrés es hídrico o aumento de temperatura; capítulo 3.4).

Se ha observado que en condiciones de sequía las remolachas también acumulan otras sustancias como **azúcares reductores** (Antolín & Sánchez-Díaz 1993) y **sacarosa**. Se ha descrito la acumulación de **glucosa** en las raíces acumuladoras y de **sacarosa** en hojas y raíces en respuesta a la sequía prolongada (Chołuj et al. 2008).

En remolacha azucarera se ha constatado que la concentración de iones y solutos compatibles ( $K^+$ ,  $Na^+$ , aminoácidos, glicina betaína, glucosa y fructosa) disminuye durante el crecimiento y presenta mayores concentraciones en sequía. Sin embargo, cuando se le añade la concentración de sacarosa, la suma de todos los solutos examinados es constante en todo el periodo vegetativo. Se ha constatado una estrecha correlación negativa entre la concentración de solutos compatibles y sacarosa. Los solutos son utilizados para disminuir el potencial hídrico en condiciones de sequía (Hoffmann 2010).

Bajo condiciones de sequía severa (30% de la capacidad de campo), la concentración de sacarosa de la raíz de almacenamiento se reduce. Esta reducción es más importante en la remolacha forrajera. El número de anillos de crecimiento no varía con la sequía pero si disminuye el tamaño de las células y la distancia entre anillos. Se ve reducida la expansión celular (Hoffmann 2010).

En variedades resistentes a la sequía se ha constatado una mayor acumulación de solutos compatibles en hojas y raíces en condiciones de estrés hídrico. Los genotipos resistentes muestran además una menor pérdida de agua foliar, mayor producción de raíces fibrosas y una mayor pérdida de la parte aérea en condiciones de sequía (Shaw et al. 2002).

**Tabla I.1.** Efectos primarios y secundarios en las plantas del estrés por déficit hídrico, salinidad y alta temperatura. Adaptado de (Taiz et al. 2015)

<b>Factor</b>	<b>Efecto primario</b>	<b>Efecto secundario</b>
Déficit hídrico	Reducción del potencial hídrico Deshidratación celular Resistencia hidráulica	Reducción de la expansión celular y foliar Reducción de la actividad celular y metabólica Cierre estomático Inhibición fotosintética Abscisión foliar Reparto alterado del carbono Citorraxis (retracción y colapso de las paredes celulares poco rígidas por pérdida de agua) Cavitación Desestabilización de membranas y proteínas Producción de ROS Citotoxicidad de iones Muerte celular
Salinidad	Reducción del potencial hídrico Deshidratación celular Citotoxicidad de iones: desnaturalización de proteínas	= déficit hídrico
Altas temperaturas	Desestabilización de membranas y proteínas	Inhibición de fotosíntesis y respiración Producción de ROS Muerte celular

### 1.3.4. Déficit hídrico y metabolismo del carbono

Cuando las plantas se enfrentan al déficit hídrico del suelo, el crecimiento se reduce y la concentración de carbono aumenta (Muller et al. 2011). El aumento de carbohidratos solubles bajo déficit hídrico ha sido reportado en numerosas especies, en diversas partes de la planta y en diferentes formas de carbono: en hojas de maíz (Kim et al. 2000), algodón (Timpa et al. 1986), cebada (Teulat et al. 2001) y eucalipto (Quick et al. 1992). Los carbohidratos también se acumulan en tallos, flores y frutos (Liu et al. 2004; McLaughlin 2004; Mercier et al. 2009), y también en las raíces (Sharp et al. 1990; Jiang & Huang 2001). La acumulación sucede tanto tras un choque osmótico rápido, con polietilenglicol (PEG) o manitol (Zrenner & Stitt 1991) como durante un lento desarrollo del déficit hídrico (Cramer et al. 2007; Hummel et al. 2010).

El déficit hídrico desacopla la fotosíntesis y el crecimiento mientras el metabolismo del carbono se mantiene o se incrementa (Muller et al. 2011). Este aumento del carbono y disminución del crecimiento, es posiblemente debido a que la expansión de los órganos se ve afectada de forma más temprana y más intensiva que la fotosíntesis y el metabolismo. Ha sido observado repetidamente el mantenimiento de la fotosíntesis durante el estrés hídrico (Boyer 1970; Quick et al. 1992; Borgeat-Triboulot et al. 2007). La actividad Rubisco se mantiene incluso en hojas con contenidos hídricos relativos por debajo del 50% mientras los estomas están cerrados en un 70% (Kaiser 1987; Flexas et al. 2006). Pero, en contraste, el déficit hídrico reduce dramáticamente la tasa de expansión de tallos y raíces (Boyer 1970; Hsiao 1973; Ben Haj Salah & Tardieu 1997; Tardieu et al. 1999; Tardieu et al.

2000). El impacto del déficit hídrico en el metabolismo del C ha sido objeto de numerosos estudios. En la mayoría, las enzimas mantienen o aumentan su actividad. En *Arabidopsis* ha sido estudiado en el desarrollo de la roseta, la actividad de 30 enzimas implicadas en el metabolismo de C y N, bajo diferentes condiciones de disponibilidad hídrica (Hummel et al. 2010). En cuanto al metabolismo del C, en la mayoría de los casos, las actividades enzimáticas aumentaron bajo el efecto del déficit hídrico pero este incremento fue lento y de baja magnitud, sugiriendo que aunque la planta haga frente a una pérdida del 75% de la producción de la biomasa aérea, esto no conlleva una reprogramación dramática o específica del metabolismo (Muller et al. 2011). Resultados obtenidos en esta tesis en la campaña número dos mostraran que en nuestras condiciones de cultivo de siembra otoñal y tras un golpe de calor combinado con déficit hídrico, una importante pérdida de la masa aérea, sí tiene una importante repercusión en la producción.

Bajo condiciones de riego adecuado se da una estrecha relación entre la disponibilidad de C y el crecimiento demostrado de los órganos fuente, y la limitación de recursos en los órganos sumideros como raíces, hojas (noche), flores y frutos (Sadras & Milroy 1996). Estas relaciones probablemente reflejan los diferentes usos de los compuestos de C: combustible, construcción, turgencia, señalización del desarrollo y del metabolismo (Muller et al. 2011). Bajo el estrés hídrico estas relaciones son modificadas sugiriendo que otros mecanismos, que posiblemente incluyen la reología de la pared celular (Fan & Neumann 2004) y los flujos de agua para el crecimiento celular (Tang & Boyer 2002) anulan el papel del C y toman la iniciativa en el control del crecimiento.

### **1.3.5. El estrés por temperatura afecta a un amplio espectro de procesos fisiológicos**

Uno de los tipos de estrés más común que rodea a las plantas es el estrés por temperatura (Iba 2002). La mayoría de los tejidos con crecimiento activo de las plantas superiores no sobreviven a exposiciones prolongadas a temperaturas por encima de los 45° C. Breves periodos de exposición a temperaturas subletales suelen inducir la adquisición de termotolerancia (Taiz & Zeiger, 2006).

Han sido identificados diferentes mecanismos para asegurar la supervivencia y el crecimiento de las plantas a temperaturas elevadas o con escasez de agua. Incluyen adaptaciones evolutivas fenológicas y morfológicas a largo plazo y mecanismos de evitación o de aclimatación a corto plazo. (Vile et al. 2012). Muchos procesos biológicos elementales y rasgos morfológicos del crecimiento de las plantas subyacente son sensibles a la temperatura, y sus respuestas se asemejan repetidamente en una distribución en forma de campana (Vile et al. 2012). La temperatura juega un papel fundamental en el consumo de agua de las plantas y en la actividad enzimática celular. También afecta de forma importante al balance de carbono. Cuando la temperatura se eleva por encima de un determinado umbral, procesos tales como la tasa de fotosíntesis neta se ven afectados negativamente (Körner 2006; Sage & Kubien 2007; Parent et al. 2010) en última instancia conduce a una disminución en el rendimiento de la planta. También la respiración se ve inhibida por las altas temperaturas pero a

temperaturas crecientes, la tasa fotosintética cae antes que la respiración (Berry & Björkman 1980). Esta variación de la relación respiración/fotosíntesis depende del tiempo que dure la exposición (Covey-Crump et al. 2002) y de la especie en estudio (Bernacchi et al. 2001).

Incluso los aumentos moderados de la temperatura del aire (Lafta & Lorenzen 1995; Loveys et al. 2002) o la disminución de la disponibilidad de agua del suelo (Stirzaker & Passioura 1996) son responsables de daños en el crecimiento de las plantas. La temperatura también es el principal determinante de la fenología de la planta (Ritchie & NeSmith 1991) y los aumentos moderados de la temperatura del aire en general, aceleran el ritmo de los procesos de desarrollo que conducen a la floración temprana en la mayoría de las especies silvestres y cultivadas (Johnson & Thornley 1985). Mientras los efectos del déficit hídrico en la fenología se hacen difíciles de determinar, se observa a menudo retrasos en el momento de la reproducción en relación con la temperatura en las especies cultivadas (McMaster et al. 2009). Los efectos de las altas temperaturas y el déficit de agua también dependen de la etapa fenológica en que se producen (Prasad et al. 2008). Las altas temperaturas tienen mayores impactos en el rendimiento de semilla durante la fase reproductiva (Jenks & Wood 2010). En esta tesis se muestran resultados que confirman que una combinación de estrés hídrico y golpe de calor tiene mayores consecuencias en el cultivo joven que en estado avanzado (resultados de la segunda campaña).

El estrés por temperatura interrumpe el metabolismo por su efecto diferencial en la estabilidad de las proteínas y las reacciones enzimáticas, causando desacople de diferentes reacciones y la acumulación de intermediarios tóxicos y ROS. Los cambios en la fluidez de la membrana desacoplan diferentes complejos multiprotéicos, interrumpen el flujo de electrones y las reacciones energéticas, interrumpen la homeostasis y el flujo de iones. Puede bloquear la degradación proteica, causando la formación de agregados proteicos que interrumpen la función celular normal al interferir con el citoesqueleto y la asociación de orgánulos (Tabla I.1) (Taiz et al. 2015).

En la **remolacha azucarera**, la evolución de la cobertura del dosel depende principalmente de la temperatura y con frecuencia se alcanza la cobertura máxima después de 8 a 10 semanas, aproximadamente. El crecimiento foliar es una función lineal de la temperatura por encima de 3 °C, y en el campo el crecimiento foliar está relacionado con la función lineal de grados día acumulados calculados con una temperatura base de 1° C (Milford et al. 1985).

La temperatura y la disponibilidad de agua influyen decisivamente sobre la duración de cada fase del desarrollo de la planta (Rinaldi & Horemans 2014). La duración del tiempo en que permanecen verdes las hojas (y por lo tanto el dosel) depende de la temperatura y el estrés hídrico (Rinaldi & Horemans 2014)

Se han obtenido datos de un crecimiento foliar más rápido a 24 °C, y un crecimiento más rápido de las raíces acumuladoras entre 24° C y 17 °C en ensayos con cultivos a temperaturas



constantes (rango de 10° a 31° C). En estos estudios, las plantas con el mismo peso seco, tenían mayores raíces y menores áreas foliares a 24 °C y tenían más hojas a 17 °C. (Terry 1968; Milford & Riley 1980). La concentración de azúcar en la raíz acumuladora depende del tamaño de la raíz. La temperatura afecta a la tasa y a los patrones de desarrollo. La radiación afecta a la tasa pero no a los patrones de desarrollo (Terry 1968).

Los efectos de diferentes temperaturas en remolacha han sido medidos en combinación con la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, con una diferencia de 3 °C entre los tratamientos y en rangos de temperatura entre 5-30 °C. Las temperaturas más cálidas aceleraban el desarrollo y el crecimiento temprano de las hojas pero tenían un efecto negativo en la biomasa total final. En estas condiciones no se detectó efecto en la producción de glicina-betaina. Bajo las condiciones más cálidas se reduce la materia seca de la raíz en un 9%, la producción de sacarosa en peso fresco en un 1% y se elevó la concentración de alfa-aminos en un 21% (Demmers-Derkes et al. 1998).

También se han ensayado temperaturas entre 15 °C y 25 °C combinadas con cantidad de nitrógeno. En este caso las temperaturas más altas (25 °C) promovían una rápida expansión y crecimiento celular en los primeros momentos del desarrollo, pero en las yemas y en las hojas en crecimiento descendía rápidamente su T<sup>a</sup> óptima de crecimiento a 15-18 °C. La concentración de sacarosa fue mayor a 15 °C que a 25 °C en hojas y al revés en la raíz acumuladora (Terry 1970).

### 1.3.6. Alteraciones morfológicas en respuesta al estrés abiótico

Las plantas pueden activar programas de desarrollo que alteren su fenotipo (plasticidad fenotípica). Este proceso resulta de los cambios anatómicos adaptativos que las plantas son capaces de hacer para evitar alguno de los efectos dañinos del estrés abiótico (Taiz et al. 2015).

Las plantas reducen su área foliar: por disminución de la división y la expansión celular de la hoja, alterando la forma de la hoja o iniciando la senescencia y abscisión de la hoja. Durante el déficit hídrico las hojas pueden orientarse paralelas a los rayos solares (paraheliotropismo). También la marchitez y el enrollamiento minimizan la superficie expuesta (Taiz et al. 2015).

**La tasa raíz/tallo** está dirigida por un balance funcional entre la entrada de agua por la raíz y la fotosíntesis que realiza el tallo. Cuando el agua del tallo se vuelve limitante, la expansión foliar se reduce cuando la actividad fotosintética ha sido afectada. En remolacha azucarera, bajo estrés por sequía, se ha detectado que la relación de la raíz de almacenamiento/ hojas en materia seca disminuye, indicando una reparto diferente de los fotoasimilados (Marschner 1995; Hoffmann 2010; Shaw et al. 2002).

En la remolacha azucarera se utilizan una serie de **parámetros agronómico** que ilustran el crecimiento de las diferentes partes de la planta, la acumulación de solutos, de sacarosa y el estado hídrico de la planta: Producción de hojas y raíces, porcentaje de materia seca de raíz, porcentaje de

materia seca de hoja, brix de la raíz, área foliar específica, superficie foliar específica, polarización, acumulación de alfa-aminos, azúcar/Ha (Morillo-Velarde & Ober 2006).

Para las plantas es peligroso reajustarse cuando desaparecen las condiciones estresantes. Algunas plantas mantienen cierta preparación al estrés como mecanismos regulatorios, hormonas, o modificaciones epigenéticas activas aunque haya pasado el estrés. Esto les confiere cierta “memoria” ya que responderán más rápidamente si el estrés se produjera de nuevo (Taiz et al. 2015)

### **1.3.7. Estrés por altas temperaturas y estrés por déficit hídrico: efectos sumativos**

El estrés por alta temperatura y el estrés por déficit hídrico a menudo suceden simultáneamente en el campo, pero poco se sabe sobre sus efectos combinados en el crecimiento de las plantas, su desarrollo y fisiología (Machado & Paulsen 2001; Zhang et al. 2008).

Estos dos tipos de presiones ambientales, tienen contrastados efectos sobre los patrones de asignación de biomasa a los órganos y tejidos. Por ejemplo, la asignación a las raíces aumenta rápidamente en respuesta a un moderado déficit hídrico del suelo (Boyer 1985), mientras que el contenido relativo del agua en la hoja y el área foliar específica (SFE) se ven disminuidos en las plantas sometidas a estrés hídrico (Poorter et al. 2009). La estructura de la hoja también se ve afectada por la temperatura, pero, en contraste con el déficit hídrico, una temperatura más alta a menudo conduce a la producción de hojas más delgadas con mayor superficie foliar específica (Boese y Huner 1990 ; Loveys et al 2002 ; Luomala et al 2005 ; Poorter et al. 2009).

Estos cambios morfológicos van acompañados de cambios en la anatomía foliar. Las hojas desarrolladas bajo déficit hídrico tienen células generalmente más pequeñas en el parénquima y la epidermis (Lecoeur et al. 1995) y mayor densidad estomática (Aubert et al 2010; Tisne et al 2010. Wahid et al. (2007) reportaron efectos similares del estrés hídrico y térmico en la densidad celular, pero existen pocos datos disponibles sobre los cambios en la anatomía de la hoja en respuesta a las altas temperaturas.

Hay importantes evidencias de que estos dos tipos de estrés interactúan para influir en el funcionamiento de la planta (Rizhsky, Liang y Mittler 2002; Rizhsky et al., 2004). Por ejemplo, la sequía induce el cierre de los estomas y reduce los flujos de transpiración (Hsaio 1973). Esto a su vez puede causar un aumento de la temperatura de la hoja al reducir la refrigeración por transpiración (Cook, Dixon y Leopold 1964) y potencialmente, aumenta la susceptibilidad de la planta a una mayor temperatura del aire. El aumento de la temperatura de la hoja también puede aumentar la pérdida de agua por transpiración (Lafta y Lorenzen 1995) y la disminución del crecimiento de las raíces (Kuroyanagi y Paulsen 1988), lo que aumenta la susceptibilidad de las plantas a la escasez de agua. En contraste, los cambios en la orientación de la hoja en respuesta a la temperatura elevada (Fu y Ehleringer 1989), tales como la hiponastia (Koini et al 2009; Van Zanten et al 2009) modifican el

balance energético de la hoja y podrían contribuir al ahorro de agua mediante la limitación de aumentos en temperatura de la hoja y de la demanda evaporativa. La hiponastia también podría aumentar el consumo de agua si se asocia con un aumento de la transpiración. Por último, los efectos de la alta temperatura sobre el crecimiento podrían conducir a una reducción de área foliar, lo que limita las pérdidas de agua de la planta y mitigar así los efectos de la sequía (Vile et al. 2012).

Ante la multiplicidad de interacciones, e incluso de algunos efectos opuestos entre estos dos estreses, parece difíciles predecir las respuestas de las plantas a la combinación altas temperaturas y déficit hídrico (Vile et al. 2012).

A pesar de los posibles efectos interactivos implicados en respuesta de la planta a altas temperaturas y déficit hídrico, lo que sí ha sido demostrado es que niveles moderados de estas dos tensiones tienen efectos aditivos en un amplio conjunto de características de la planta relacionadas con el crecimiento y desarrollo de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Vile et al. 2012).

En ensayos con *Arabidopsis thaliana* se ha evaluado el efecto del estrés térmico e hídrico por separado y de forma combinada (Vile et al. 2012). La tabla I.2 muestra un resumen de los resultados de Vile et al. 2012 de los mecanismos desarrollados en esta planta ante estas presiones.

**Tabla I.2.** Parámetros afectados por el estrés hídrico, térmico o combinado en ensayos con *A. thaliana*. Datos extraídos de Vile et al. 2012.

Parámetro	Déficit hídrico	Temperatura	Combinado
Producción de hojas	Disminuyen 23%	Disminuyen 16%	Disminuye 40%
Duración ciclo vital	No	Acortado	
Biomasa total planta	Sobre 50%	Sobre 50%	Sobre 85%
Biomasa raíz	Aumenta	No	
Biomasa reproductiva		Aumenta	
% Materia seca de hojas	Aumenta	Disminuye	Aumenta más que con solo sequía
Superficie foliar específica		Hojas más delgadas Mayor SFE	Menor que sólo calor
Morfología foliar	Disminuye longitud limbo/longitud total hoja (menor peciolo)	Hiponastia Aumenta longitud limbo/longitud total hoja (mayor peciolo)	
Fotosíntesis		Disminuye	
ABA hojas	Aumenta	Aumenta	Aumento mayor

Existen muy pocos trabajos sobre el efecto de la temperatura en la remolacha. Y aún son más escasos los relacionados con temperaturas extremas como las presentes en el verano andaluz y su interacción con la disponibilidad hídrica. En el caso de la remolacha azucarera, las altas temperaturas que se alcanzan al principio de verano en la siembra otoñal y las temperaturas medias-altas durante todo el verano en la siembra primaveral, inciden perjudicialmente en la calidad de la raíz obtenida (Gordo 2003). Con temperaturas superiores a 35 °C se observa un descenso acusado de la pureza en el jugo de la remolacha en la zona sur (Zavala 1994). Uno de los objetivos de esta tesis es aumentar

dicho conocimiento sobre el efecto de las altas temperaturas (golpes de calor) combinados o de forma independiente con estrés hídrico.

Recientemente ha sido expresada la preocupación por el efecto potencialmente serio en la agricultura del cambio radical en la temperatura global en un futuro cercano. A mediados del siglo veintiuno, el calentamiento global que resulte del incremento de las concentraciones atmosféricas del dióxido de carbono y otros gases invernaderos podría poner en peligro la agricultura, los bosques y otras industrias que utilicen el medio natural (Watson et al. 2001). El cambio climático global presumiblemente aumentará la aparición y ampliará la distribución de las altas temperaturas y la sequía, lo que llevará a una mayor reducción de la productividad y cambios en la biodiversidad (Chaves et al 2002; Lobell y Asner 2003; Porter 2005; Thuiller et al. 2005; IPCC 2007). Se han realizado muchas investigaciones dirigidas a evaluar el efecto del cambio climático en estas industrias que utilizan el medio natural (Ayres & Lombardero 2000; Rosenzweig 1985; Smit & Skinner 2002) (Newman, 1980; Rosenzweig et al. 1994), pero los esfuerzos de los investigadores hacia enfoques prácticos y específicos para mejorar la adaptabilidad de las plantas a la alta temperatura ambiental han comenzado más recientemente (Grover et al. 2000; Sharkey 2000).

La cuenca Mediterránea será una de las zonas más afectadas por el cambio climático. En un siglo se producirá un incremento de temperatura de 1 a 5,5 grados en la zona mediterránea, que se traducirá en la reducción de precipitaciones y en acontecimientos climáticos extremos que marcarán una tendencia a la aridificación. Tendrá repercusiones graves en la agricultura, la industria y la vegetación. Además provoca un incremento de la salinización por la evaporación, alteraciones y retrasos en los ciclos de floración y fructificación, así como un incremento de las plagas y la invasión de especies exóticas (Rubio and Millán, 2005).

El desarrollo de cosechas con tolerancia mejorada a las condiciones de estrés abióticos es la meta de la investigación agrícola. La investigación en estrés abiótico persigue comprender como las plantas perciben y se aclimatan a las condiciones de estrés ambiental y usar este conocimiento para desarrollar plantas y cultivos que aumenten la tolerancia al estrés abiótico (Taiz et al. 2015).

Dentro de esta problemática global, el estudio de la influencia de los golpes de calor aportaría mayor conocimiento sobre el comportamiento del cultivo y la fisiología de la remolacha de siembra otoñal. Experiencias como ésta, concretas y contextualizadas, pueden ayudar a la adaptación de los sistemas agrarios a los cambios que se están produciendo.

#### 1.4. RIQUEZA DE LA RAÍZ: METABOLISMO DE LA SACAROSA

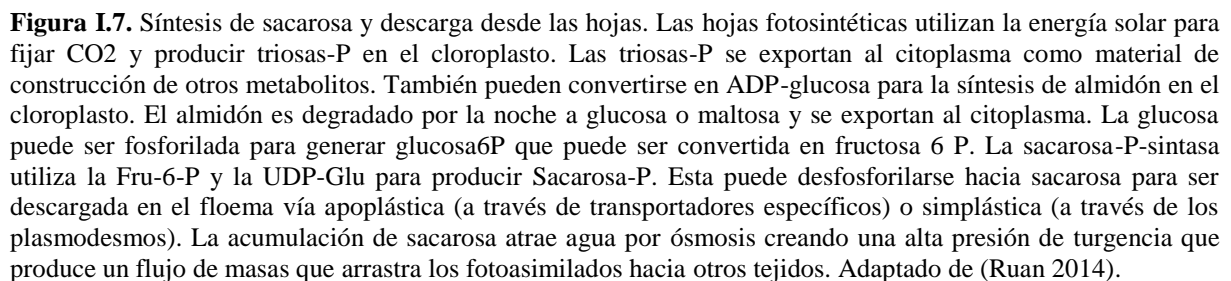
---

A partir de las triosas-P generadas como consecuencia de la actividad fotosintética (Ciclo de Calvin) las plantas sintetizan almidón en el cloroplasto y sacarosa en el citosol. Son los carbohidratos de reserva más importantes y desde un punto de vista agrícola, los más importantes para la alimentación humana.

La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa  $\alpha$  (1-4). El metabolismo de la sacarosa juega un papel central en el desarrollo de las plantas, la respuesta a estrés y el rendimiento. Esto se debe sobre todo a la generación a partir de la sacarosa, de todo un amplio rango de azúcares usados como combustibles para el crecimiento, síntesis de componentes esenciales y como señales que regulan la expresión de microARNs, factores de transcripción y señales para el diálogo con la respuesta hormonal, oxidativa y defensiva (Ruan 2014).

La sacarosa es exportada continuamente hacia los distintos sumideros mediante translocación a través del complejo tubos cribosos/células acompañantes del floema. La carga de sacarosa en el floema en las fuentes y la descarga en los sumideros, genera diferencia en la presión de turgencia a través del efecto osmótico de la sacarosa. Esta diferencia de turgencia conduce a un flujo en masa de agua que transporta los fotoasimilados hacia los sumideros. El transporte de sacarosa controlado hacia el floema es la ruta fundamental a través de la cual son exportados los recursos (nutrientes, agua y moléculas señalizadoras) hacia los tejidos meristemáticos (Ruan et al. 2012). La sacarosa se emplea para el transporte por su gran solubilidad en agua y por su naturaleza no reductora (disminuye la probabilidad de interacción con otras moléculas durante el transporte). Los controles en la importación y exportación de carbohidratos contribuyen a adaptar el metabolismo del carbono a los cambios ambientales y a la disponibilidad de otros nutrientes. En general, los bajos niveles de azúcar activan la fotosíntesis, la movilización de las reservas y la exportación, mientras que la abundancia de azúcar promueve el crecimiento y el almacenamiento de carbohidratos (Taiz et al, 2015).

En la figura I.7 se muestran los mecanismos de síntesis de la sacarosa en las hojas y su descarga en el floema.



La hidrólisis, acumulación y traslocación de la sacarosa es un proceso versátil y altamente regulado (Fig.I.8). La sacarosa es sintetizada primariamente en el citosol de las hojas maduras por la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS) y por la enzima sacarosa fosfato fosfatasa (SPP). Pero este metabolito puede ser resintetizado en los tejidos sumideros. Esto sucede sobre todo cuando la entrada del contenido del floema en los sumideros ocurre por la vía apoplástica, lo que en ocasiones es precedido de la rotura de la sacarosa en Fru y Glu en el espacio extracelular. En esta situación es

necesario resintetizar la sacarosa para el almacenaje o el transporte adicional intracelular. Aunque la rotura y resíntesis de la sacarosa puede parecer un despilfarro energético, este ciclo fútil permite un preciso control del reparto de los carbohidratos (Ruan 2014).

La sacarosa es degradada por la invertasa (INV; EC 3.2.1.26) o la sacarosa sintasa (Sus o SS; EC 2.4.1.13) en hexosas o sus derivados que son utilizados en diversas rutas. Parte de los objetivos de esta tesis están encaminados a evaluar el impacto de las altas temperaturas y/o el estrés hídrico en estas enzimas hidrolíticas de la sacarosa y su repercusión en el cultivo.

### **Sacarosa sintasa (SS)**

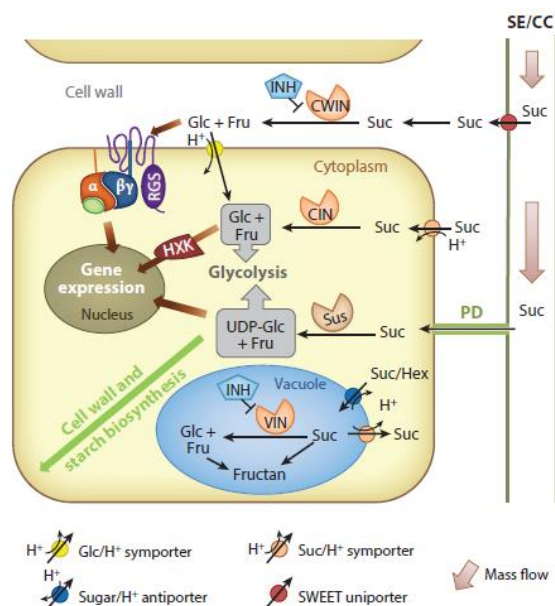
Localizada en el citoplasma, cataliza la hidrólisis reversible de sacarosa con UDP (Tsai 1974), produciéndose fructosa y conservando la energía del enlace glucosídico en UDP-Glc. Aunque la reacción es reversible, in vivo la enzima participa sólo en reacciones catabólicas y no de síntesis (Sturm & Tang 1999).

Aunque la SS utiliza preferentemente el nucleótido UDP, numerosos estudios han mostrado que el ADP también funciona como un efectivo aceptor molecular para producir ADP glucosa (Diego & Jolla 1972; Murata et al. 1966; Nakai et al. 1998; Porchia et al. 1994; Ross & Davies 1992; Silvius & Snyder 1979; Tanase & Yamaki 2000). La SS tiene un doble papel produciendo UDP-glucosa (necesaria para la biosíntesis de pared celular y glicoproteínas) y ADP-glucosa (necesaria para la biosíntesis de almidón) (Baroja-Fernández et al. 2003).

### **Las invertasas (IN)**

Catalizan la hidrólisis irreversible de sacarosa en glucosa y fructosa. Las invertasas parecen implicadas en un amplio rango de funciones reguladoras en el crecimiento y desarrollo de las plantas además de su papel central en el metabolismo primario del carbono (Barratt et al. 2009; Jin et al. 2009).

Se clasifican en distintas isoformas: Invertasa de pared celular (CWIN), invertasa vacuolar (VIN) y invertasa citoplasmática (CIN) de acuerdo con su localización subcelular y su pH óptimo (Sturm 1999). Aunque la invertasa vacuolar y la invertasa de pared están localizadas en diferentes compartimentos, tienen propiedades bioquímicas comunes, presentando actividad máxima en un rango de pH 4,5-5,5, por lo que han sido denominadas invertasas ácidas (IA) (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1997). En cambio, la invertasa citoplasmática (CIN) presenta un pH óptimo neutro alcalino de 7,0-7,8 para hidrolizar la sacarosa en el citosol, por lo que se la ha denominado invertasa neutra (IN).



**Figura 1.8.** La descarga de la sacarosa del floema, su transporte y metabolismo en los tejidos sumidero. La sacarosa entra desde el floema en las células sumideros vía simplástica o apoplástica. En la vía apoplástica, la sacarosa sería hidrolizada por la Invertasa de Pared Celular (CWIN) en glucosa (Glu) y fructosa (Fru) antes de entrar al citoplasma. La glu apoplástica sería detectada por un receptor (RGS; Regulator of G-protein signaling) acoplado con una proteína G para la señalización. La sacarosa importada vía plasmodesmos (PDs) o incluida mediante transportadores, puede ser degradada por la invertasa citoplasmática (CIN) y la sacarosa sintasa (Sus). La sacarosa citosólica puede entrar en la vacuola por hidrólisis mediada por la invertasa vacuolar (VIN). Las actividades CWIN y VIN pueden ser bloqueadas por sus respectivos inhibidores (INHs). Las hexosas (Hex) intracelulares son usadas para la glucólisis y la síntesis de polímeros como el almidón, la celulosa o los fructanos. Los niveles y flujos de las hexosas pueden ser percibidos por una hexoquinasa localizada en el núcleo (HXK) u otras proteínas que regulan a expresión genética. Además, las hexosas y la sacarosa pueden modular directamente la transcripción de genes que contengan elementos de respuesta a azúcares (incluyendo a los que codifican para factores de transcripción). No se muestra como la sacarosa, la trehalosa y las hexosas sintetizadas se exportan de las vacuolas al citoplasma. Se muestran varios transportadores involucrados. SE/CC: complejo elementos cribosos/células acompañantes. Adaptado de (Ruan 2014).

La importancia relativa de cada una de estas actividades degradativas de la sacarosa, está estrechamente relacionada con el momento del desarrollo de la raíz, las condiciones ambientales y la aparición de heridas o infecciones.

#### 1.4.1. La Sacarosa Sintasa (SS): Un marcador de la fuerza de los sumideros en los cultivos.

SS está presente en todas las células vegetales y presenta una gran versatilidad. Esta enzima ha sido considerada un marcador bioquímico de la fuerza que presentan los sumideros, especialmente en órganos voluminosos donde los niveles internos del oxígeno pueden ser bajos (Xu et al. 2012). En los órganos sumideros de carbohidratos es a menudo la actividad sucrolítica predominante ya que la rotura de sacarosa por esta enzima es más eficiente energéticamente que por las invertasas. La actividad SS es mucho mayor en semillas y frutos en desarrollo que en las hojas (Fallahi et al. 2008; Xu et al. 2012).



Existen evidencias determinantes del papel de SS en el desarrollo de los sumideros en especies cultivables. La supresión de la expresión de SS da como resultado semillas enanas de maíz (Chourey et al. 1998) y algodón (Ruan et al. 2003) además de reducir la acumulación de almidón en los tubérculos de patata (Zrenner et al. 1995). Además, un conjunto de estudios de supresión y sobreexpresión han establecido una importante correlación positiva entre los cambios en la actividad SS y el crecimiento de semillas y fibras de algodón (Jiang et al. 2012; Ruan et al. 2003; S. Xu et al. 2012).

En contraste con esta alta sensibilidad a los cambios de la actividad SS en los sumideros cosechados, el cuádruple mutante de *Arabidopsis*, *sus1*, *sus2*, *sus3* y *sus4* (genes que codifican para distintas isoformas de SS) exhibe un crecimiento y desarrollos normales (Barratt et al. 2009). El análisis global indica que el desarrollo de grandes sumideros es altamente dependiente de la actividad SS, lo que puede ser una consecuencia de la selección y domesticación de sus genotipos salvajes (Ruan 2014).

La actividad SS aparece íntimamente relacionada con la biosíntesis de celulosa, almidón, lípidos y proteínas en las semillas en desarrollo. En *Arabidopsis*, 5 de los 6 genes para SS (*AtSus* 2-6) no son expresados en las semillas desde la mitad hasta el final del desarrollo, mientras el otro gen *AtSus* 1, se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y fases examinados (Bieniawska et al. 2007). Aunque no es detectable en los tejidos hijos durante el desarrollo temprano de la semilla, la proteína SS se localiza abundantemente en el endospermo en celularización (Fallahi et al. 2008; Ruan et al. 2008) y durante la transferencia de células hacia la cubierta de la semilla durante el crecimiento interno de la pared (Pugh et al. 2010; Ruan et al. 2003). Estudios de la silenciación de genes han establecido que la expresión de *GhSus1* es requerida para la integridad y funcionalidad de la pared celular en semillas de algodón (Ruan et al. 2003; Ruan et al. 2008) y la sobreexpresión de SS en álamo incrementó el contenido en celulosa del xilema en desarrollo y la densidad de la madera (Coleman et al. 2009). Un ensayo de función en fracciones de membrana plasmática de hipocótilos de *Vicia faba* revela a SS como un componente integral del complejo celulosa-sintasa (Heyer et al. 2004). La contribución de SS a la producción temporal de almidón ha sido indicada en cubiertas de semilla de *Arabidopsis thaliana* (Fallahi et al. 2008). En *Vicia faba*, la transición hacia la fase de almacenamiento en los embriones está acompañada de un aumento de la actividad SS y una disminución en la actividad CWIN, lo cual se correlaciona con una alta actividad guanosina trifosfatasa (AGPasa), conduciendo a la biosíntesis de proteína y almidón (Weber et al. 1996; Weber et al. 2005).

Recientes evidencias también indican nuevos roles que SS podría jugar en el desarrollo. Por ejemplo, uno de los genes que codifican para SS fue uno de los 5 marcadores expresados en meristemos apicales de tallos (shoot apical meristems, SAM) en tomate (Pien et al. 2001). En consistencia con esto, la sobreexpresión de SS promovió la iniciación y expansión de hojas en algodón, probablemente independiente del efecto osmótico (Xu et al. 2012). Estos resultados indican que la actividad SS es crítica en la función de los meristemos.

También es notable los diferentes roles que llevan a cabo diferentes miembros de la familia de los genes que codifican para SS. Entre los tres genes de maíz, por ejemplo, *ZmSus1* contribuye a la biosíntesis de almidón en la semilla, *ZmSus2* es responsable de la integridad de la pared del endospermo y *ZmSus3* puede estar implicado en la formación de células de transferencia en el endospermo basal (Chourey et al. 1998).

La localización de las distintas isoformas de SS continúa investigándose. Se ha postulado que la SS puede encontrarse asociada a membrana (Sus-m) y canaliza su producto, UDP-Glc, hacia la síntesis de celulosa y calosa (Amor et al. 1995; Winter & Huber 2000; Koch 2004; Haigler et al. 2001). La importancia de SS en este proceso se ha hecho evidente mediante la sobreexpresión (Konishi et al. 2004) génica y la supresión o mutación (Chourey et al. 1998; Ruan et al. 2003). También se ha aportado que en *Beta vulgaris*, SS puede localizarse en el tonoplasto, liberando fructosa y UDP-Glc al citosol en presencia de UDP (Etxeberria & Gonzalez 2003). Experimentos en cebada han demostrado que en situación de plasmólisis, la SS queda anclada a la membrana plasmática. Se han descrito para las isoformas de cebada dos dominios transmembrana en su secuencia genética (Barrero-Sicilia et al. 2011). No se descarta la asociación de SS a elementos del citoesqueleto (Staehelin 1997; Winter et al. 1998), al Aparato de Golgi (Buckeridge 1999), plástidos (Nuñez et al. 2008) y mitocondrias (Subbaiah et al. 2006).

La expresión de las cuatro isoformas de la cebada se estudió en distintas condiciones de estrés: en sequía aumentaba la transcripción de *HvSs1* y el enfriamiento en las hojas activaba las isoformas *HvSs1* y *HvSs2* (Barrero-Sicilia et al. 2011).

En la abundancia de Sus-m in vivo están implicados factores como el pH, los recursos de la membrana y la concentración de SS y sacarosa (Hardin et al. 2006), efectores como el  $\text{Ca}^{+2}$  y un proceso de fosforilación reversible. En *Beta vulgaris* han sido descubiertas dos isoformas: SBSS1 y SBSS2. Ambas se expresan mayoritariamente en raíz, siendo escasa su presencia en hojas y flores. SBSS2 muestra mayor expresión y actividad en etapas tempranas del desarrollo de la raíz y SBSS1 mantiene niveles mayores de expresión en las etapas media y finales (Haagenson et al. 2006).

En remolacha azucarera ha sido determinado el patrón de expresión de los distintos genes (Northern-Blot y RT-PCR) de las enzimas encargadas del metabolismo de degradación de la sacarosa, en los diferentes órganos y diferentes condiciones de cultivo. En estos ensayos se determinó que la enzima SS se expresa fundamentalmente en raíz, más que en otros órganos y que además, de las enzimas analizadas (IA, IN, SS), es la que mayor expresión muestra (González et al. 2005).

## Regulación de la actividad SS

La actividad SS está regulada por una serie de mecanismos (Karen Koch 2004). Los genes de SS son activados en situaciones de privación de carbohidratos y también está fuertemente inducidos en bajas condiciones de oxígeno y muestra patrones de expresión estrechamente relacionados con la importación de la sacarosa proporcionando prioridad de supervivencia a tejidos clave (Koch 1996; Koch et al. 2000; Zeng et al. 1998).

A pesar de la "estabilidad extrema" de la sacarosa sintasa bajo ciertas condiciones (Halford et al. 2004) cada vez es más evidente que varios mecanismos contribuyen a controlar adecuadamente su recambio en la célula. En primer lugar, la fosforilación que activa a la enzima (Huber et al. 1996; Zhang et al. 1995) está implicada en la predisposición de SS a una segunda fosforilación. (Hardin et al. 2003). Esta segunda fosforilación, a su vez, dirige a la proteína para la degradación mediada por ubiquitina a través del proteosoma (Hardin et al. 2003). La primera fosforilación puede estar vinculada a la disponibilidad de azúcar y/o a otras señales (Zhang 1999; Hardin et al. 2003).

### 1.4.2. Actividades invertasas (I)

#### **Invertasa de Pared Celular (CWIN: Invertasa ácida insoluble): reguladores versátiles del reparto de carbono y del desarrollo**

Esta invertasa se expresa típicamente en sumideros durante la descarga de floema o en el siguiente transporte postfloemático que sigue a la vía apoplástica. Actuaría en la entrada de fotoasimilados hacia los sumideros, contribuyendo a crear un gradiente escalonado entre fuente y sumidero para la sacarosa (Escherich 1980).

En tomates jóvenes se expresa abundantemente una isoenzima específica de CWIN en el floema del parénquima de la placenta, donde la sacarosa entra vía apoplástica (Jin et al. 2009). La alta actividad invertasa en esta región puede facilitar la entrada de sacarosa del floema al disminuir la concentración de sacarosa en el apoplasto, creando una progresión de concentraciones entre el complejo elementos cribosos/células acompañantes y la matriz de la pared celular circundante. Es interesante que esta invertasa de pared tiene una baja expresión en el pericarpio del tomate, donde la entrada de sacarosa del floema se produce vía simplástica (Jin et al. 2009; Ruan & Patrick 1995). Estos estudios muestran que la ruta apoplástica y la simplástica podrían operar de forma simultánea en diferentes grupos celulares dentro del mismo órgano, asociado con altos o bajos niveles de CWIN, respectivamente.

La CWIN también es fuertemente expresada en regiones sin conexiones por plasmodesmos, incluyendo la interfase entre los tejidos maternos y filiales de la semilla (Weber et al. 1996; Cheng et al. 1996). La actividad invertasa produce además hexosas implicadas en la señalización que estimula la división del endospermo (Wang & Ruan 2012).

Tiene un importante papel en el desarrollo de los sumideros, como muestran las semillas en miniatura producidas en los mutantes “knout” de maíz para la CWIN2 (Cheng et al. 1996). En tomate, el silenciamiento de la invertasa de pared inhibe el desarrollo de la semilla y el fruto, mientras que la estimulación de la actividad tiene el efecto opuesto (Jin et al. 2009).

### **Invertasa Vacuolar (VIN, Invertasa Ácida soluble): funciones más allá de la acumulación de azúcar y la regulación osmótica**

Se considera que la VIN rompe la sacarosa cuando existe una alta demanda de hidrólisis, como en células en expansión (Richardo et al. 1970).

Pero la VIN juega su mayor rol en órganos que acumulan hexosas. Esto es evidenciado por la presencia de transcritos de VIN en frutos de tomate que acumulan hexosas y la ausencia de VIN en los que acumulan sacarosa (Klann et al. 1993). Además, la represión de VIN en tomates transgénicos les permite acumular sacarosa en vez de hexosas (Klann et al. 1996). Esta invertasa del tomate está estrechamente relacionada con la isoenzima de la zanahoria, esencial para su crecimiento (Tang et al. 1999). Al convertir sacarosa en Glu y Fru, VIN permite una doble contribución osmótica. Por esto, durante mucho tiempo se ha considerado que tenía un importante papel en la expansión celular a través de su efecto osmótico. Se han encontrado apoyos para estas observaciones al encontrar alta actividad VIN en tejidos en rápida expansión (Ruan et al. 2010). De todas formas, esto es cierto solo si las células acumulan altas concentraciones de azúcares solubles. En tejidos como los de la raíz de *Arabidopsis* en elongación, AtVIN2 puede regular la expansión celular a través de una vía osmóticamente independiente (Sergeeva et al. 2006).

### **Invertasa citoplasmática (CIN, Invertasa Neutra soluble): nuevos descubrimientos sobre su papel en la raíz y en el desarrollo reproductivo.**

CIN está localizada en múltiples compartimentos subcelulares. Además de su localización citosólica, según su secuencia genética se prevé que algunas isoformas tengan como diana el interior de los orgánulos y el núcleo. Son menos estables que las otras dos invertasas lo que contribuye a su baja actividad comparada con las otras invertasas (Ruan et al. 2003; Xiang et al. 2011). Recientes estudios indican funciones en las raíces y en el desarrollo reproductivo.

Mutantes de *Arabidopsis* con dos de los 9 genes de CIN silenciados, muestran un reducido crecimiento de la raíz (Barratt et al. 2009). También se han visto estas reducciones en el crecimiento de la raíz y reducciones en la floración en *Lotus japonicus* (Welham et al. 2009) y arroz (Jia et al. 2008). La isoformas de estas especies están estrechamente relacionadas y se localizan en el citosol (Ji et al. 2005; Murayama & Handa 2007). Aún se desconoce como CIN regula el crecimiento celular.

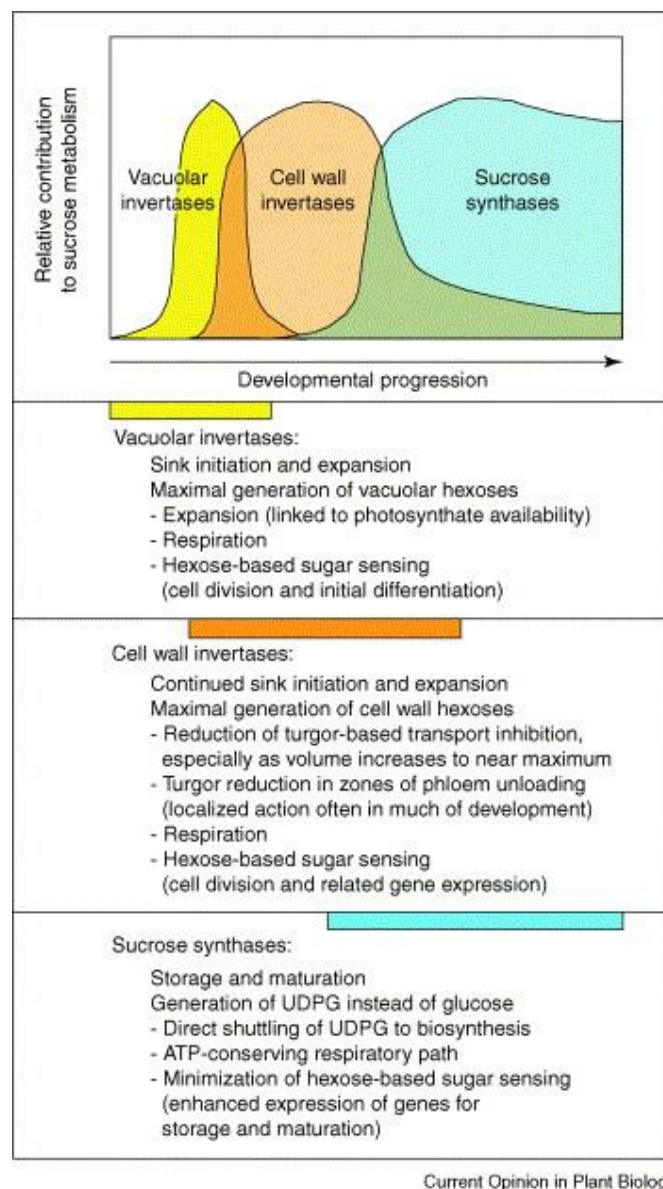
La CIN ha sido detectada en raíces de remolacha maduras (Berghall et al. 1997). Son consideradas enzimas de mantenimiento, involucradas en la degradación de la sacarosa cuando las actividades VIN, CWIN y Sus son bajas (Winter & Huber 2000).

### Regulación de las invertasas

Los genes de las invertasas están altamente regulados a nivel transcripcional y postraducciona. Estudios recientes indican que la transcripción de las invertasas ácidas podría estar regulada por la abundancia de glucosa (Koch 1996; KE Koch 2004). Recientes estudios han mostrado que estas invertasas pueden ser reguladas por inhibidores. Los inhibidores de invertasas ácidas son pequeñas proteínas caracterizadas por cuatro residuos de cisteína altamente conservados (Rausch & Greiner 2004; Ruan et al. 2010). Es necesario un pH de 4,5 (pH óptimo) para la interacción entre las invertasas y el inhibidor. Estos inhibidores no afectan a la invertasa neutra, que tiene otras vías de regulación. Trabajos en tomate muestran que gran parte de la actividad CWIN in vivo es bloqueada por los inhibidores. La eliminación de inhibidores retrasa la senescencia foliar y mejora la producción (Jin et al. 2009). La sobreexpresión del inhibidor en tabaco acelera la senescencia foliar, en parte por bloquear el efecto positivo de las citoquininas en las hojas. En esta planta, una alta actividad CWIN retrasa la senescencia y estimula la entrada de sacarosa de nuevo en las hojas (Balibrea Lara et al. 2004)

En general, las hexosas favorecen la división y la expansión celular, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación celular y la maduración. Este efecto, junto con el análisis de numerosos sistemas lleva a plantear un control invertasas/sacarosa sintasa para la transición hacia los diferentes estados del desarrollo (Wobus & Weber 1999; Borisjuk et al. 2002; Weschke et al. 2003; Borisjuk et al. 2003). De acuerdo con esta hipótesis, las invertasas mediarían la iniciación y expansión de muchas de las estructuras sumidero de nueva formación (Sturm & Tang 1999; Koch & Zeng 2002; Andersen et al. 2002), a menudo con la actividad vacuolar precediendo a la de las paredes celulares (Andersen et al. 2002; Wächter et al. 2003). La acción de la invertasa de pared celular coincide con una elevada expresión de los transportadores de hexosas en algunos sistemas (Sherson et al. 2003). La transición posterior hacia la fase de almacenaje y la maduración es facilitada por cambios en la tasa hexosa/sacarosa y por la alternancia entre las rutas de las invertasas y de la sacarosa sintasa para la rotura de la sacarosa (Fig.I.9) (Koch 2004).

En trabajos de expresión de invertasas en diferentes órganos de *Beta vulgaris* y diferentes condiciones de cultivo se ha demostrado que la invertasa ácida vacuolar (*SBVI*) muestra una expresión específica en el peciolo. También se mostró que los factores fundamentales que determinaban la expresión del gen de la invertasa vacuolar en peciolo eran el estado de crecimiento y el control circadiano. La expresión de este gen era más alta en los primeros momentos del desarrollo (32 días) y disminuía al avanzar el desarrollo de la planta (72 días). Además, presentaba oscilaciones en la expresión a lo largo del día, siendo mayor la expresión en la mitad del día y alcanzando los niveles mínimos durante la noche. La expresión se mantenía aun alterando los patrones de iluminación lo que indicaba que la expresión de la invertasa vacuolar de peciolo estaba sometida a control circadiano (González et al. 2005).



**Figura I.9.** Modelo propuesto para la distribución de las enzimas encargadas de la degradación de la sacarosa a lo largo del desarrollo. Adaptado de Koch, 2004

En la raíz de la remolacha azucarera se ha propuesto que las invertasas son responsables de la hidrólisis de la sacarosa para atender a las demandas de la respiración, que la actividad **invertasa ácida vacuolar (VIN)** se incrementa en respuesta al estrés o a los rebrotes, y que es responsable del aumento de contenido en azúcares reductores (Berghall et al. 1997). En general se propone que las invertasas ácidas (VIN y CWIN) sólo están presente en las etapas tempranas del desarrollo (Giaquinta 1979). Las IA vacuolar estarían ligadas a la movilización de reserva almacenada en la vacuola (Sampietro et al. 1980).

Las tres enzimas implicadas en la degradación de la sacarosa en la remolacha azucarera de siembra otoñal desempeñan su función en diferentes momentos del desarrollo del ciclo de vida de la

planta. La invertasa neutra citoplasmática actúa principalmente en el periodo invernal. La SS presenta niveles más altos que las dos invertasas durante todo el desarrollo, lo que sugiere un papel fundamental en el metabolismo degradativo de la sacarosa en la raíz de *Beta vulgaris* L. Esta enzima está especialmente activa en el periodo primaveral (abril-mayo). En las variedades Claudia y Ramona se ha descrito que la actividad invertasa ácida (VIN, CWIN) aparece cuando la planta se encuentra bajo situación de estrés. Se ha encontrado una buena correlación entre la actividad invertasa ácida (VIN, CWIN) y la acumulación de glucosa, sobre todo en la variedad Claudia en situaciones de déficit hídrico y en altos valores de incorporación de nitrato en planta. En el periodo estival, la variedad Ramona acumula menos glucosa y presenta menos actividad invertasa ácida (VIN, CWIN) que la variedad Claudia (Jiménez 2004). En trabajos para determinar el patrón de expresión de los distintos genes de las enzimas encargadas del metabolismo de degradación de la sacarosa en remolacha azucarera, en los diferentes órganos, variedades y condiciones de cultivo se determinó que la expresión de la SS en raíz muestra un comportamiento similar: hay niveles altos de expresión en fases tempranas del crecimiento y va descendiendo paulatinamente hacia el final de los muestreos. Pero cuando aumenta la temperatura, se aprecia un incremento de la expresión de la SS en los ensayos de abonado en exceso y siembra tardía, que podría explicar el incremento de azúcares reductores en estas condiciones. También la variedad Claudia en condiciones de déficit hídrico, que acumulaba mayor cantidad de azúcares reductores que la variedad Ramona, presentaba un incremento de la expresión de SS en las muestras de finales de julio-agosto. Esto refuerza que la sacarosa sintasa está implicada en la producción de azúcares reductores cuando suben las temperaturas. Las invertasas ácidas vacuolares aumentaron su expresión en Claudia en déficit hídrico, lo que indica que estas enzimas podrían tener una función importante en respuesta al estrés térmico e hídrico (González et al. 2005).

## 1.5. ESTADO METABÓLICO DE LA RAÍZ: FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC) Y ADENOSIN FOSFATOS

---

Los conocimientos previos de nuestro equipo de investigación sobre la PEPC y el comportamiento de los adenilatos en la siembra otoñal ha llevado a tenerlos en cuenta en el presente estudio, ya que pueden ayudar a interpretar la respuesta fisiológica de la raíz ante el estrés.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.131), es una enzima muy importante del metabolismo del C en plantas. Es fundamental en el metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> y CAM, pero está presente en todas las plantas y en todos los órganos. Se localiza fundamentalmente en el citosol aunque ha sido descrita una isoenzima cloroplastídica (Masumoto et al. 2010). Su papel fotosintético está ampliamente estudiado, pero son más limitados los conocimientos sobre su funcionamiento en otros tejidos. Está presente en las plantas superiores, algas verdes y microorganismos, pero no ha sido detectada en hongos, levaduras y animales (Chollet et al. 1996; Agetsuma et al. 2005).

La PEPC cataliza la  $\beta$ -carboxilación del PEP en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para producir oxalacetato y Pi (Chollet et al. 1996). El oxalacetato es rápidamente transformado en malato por la malato deshidrogenasa, por lo que el malato se considera el primer compuesto estable de la reacción. Es un metabolito de gran interés ya que transporta carbono y poder reductor.

La PEPC pertenece a una pequeña familia multigénica que refleja la diversidad funcional de la enzima. Se han caracterizado isoenzimas que constituyen las PEPC de tipo planta (PTPCs) que se dividen en dos categorías: fotosintéticas (C<sub>4</sub> y CAM) y no fotosintéticas (C<sub>3</sub>), y al menos una más evolutivamente separada del resto, la PEPC de tipo bacteriano (BTPC) (Toh et al. 1994; Rao et al. 2002; Besnard et al. 2003; O'Leary et al. 2011). Todas las PTPCs han evolucionado de un gen ancestral común y poseen un alto nivel de conservación genético (Svensson et al. 2003). Recientemente ha sido descrito que las PTPCs y la BTPC provienen de un linaje común procedente de las gammaproteobacterias, posiblemente a través de una transferencia horizontal de genes entre reino. En concreto desde las bacterias al ancestro común eucariota de las plantas (Peng et al. 2012).

La PEPC está formada por polipéptidos de unos 100-110 kDa que se caracterizan por contener un dominio de fosforilación en una serina localizada en el extremo N-terminal de la proteína, un tetrapéptido (QNTG) crítico y muy conservado en el extremo C-terminal, y por existir típicamente como un homotetrámero (Kai et al. 2003; Izui et al. 2004; Xu et al. 2006; O'Leary et al. 2011). In vitro, la PTPC se presenta en forma de trímero, dímero o monómero (Stiborova & Leblova 1986). La forma tetramérica es la más abundante y activa catalíticamente y el monómero carece de actividad (Walker et al. 1986; McNaughton et al. 1989; Jawali 1990; Willeford et al. 1990).

Está regulada por fosforilación reversible tanto en plantas C<sub>3</sub> como en C<sub>4</sub> y CAM. La PEPC bacteriana carece del dominio N-terminal de fosforilación (Vidal & Chollet 1997; Matsumura et al. 2002). Cuando la PEPC está fosforilada es menos sensible a su inhibidor alostérico L-malato, posee



más afinidad por su activador glucosa 6-P, y es más eficaz a pH subóptimo de 7,3 (Echevarría et al. 1994; Echevarría & Vidal 2003).

### 1.5.1. Funciones de la PEPC

En plantas superiores, la PEPC se localiza en hojas, raíces, semillas y nódulos (O'Leary 1982). Esta naturaleza ubicua de la enzima se justifica, probablemente, por la naturaleza de su producto final estable, el L-malato, que puede ser usado como fuente de carbono y poder reductor en numerosas vías metabólicas.

Además de su participación en la fotosíntesis C<sub>4</sub> y CAM, las funciones asignadas a la PEPC son numerosas. Interviene en la economía del carbono de la célula recapturando el CO<sub>2</sub> respiratorio, suministra precursores biosintéticos al ciclo de Krebs cuando hay una fuerte demanda de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (función anaplerótica) (Huppe & Urpin 1994), regula el pH celular, interviene en la fijación de nitrógeno en leguminosas, en la absorción y transporte de cationes y en el movimiento estomático. También ha sido implicada en la maduración y germinación de la semilla y en la maduración del fruto (Chollet et al. 1996; Echevarría & Vidal 2003; Izui et al. 2004).

La función anaplerótica es especialmente importante en tejidos no fotosintéticos (Latzko & Kelly 1983). Durante la síntesis de aminoácidos, los ácidos orgánicos procedentes del ciclo de Krebs son transportados desde la mitocondria al citosol y de ahí al estroma del cloroplasto para la asimilación de NH<sup>4+</sup> en el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa mediante en ciclo GS/GOGAT, disminuyendo la tasa de regeneración de oxalacetato (OAA) y/o malato de la mitocondria (Champigny & Foyer 1992). En este sentido, la reacción catalizada por la PEPC puede ser considerada como el inicio de una rama de la ruta glucolítica.

Durante la reducción del NO<sup>3-</sup>, que consume protones, la actividad PEPC C<sub>3</sub> aumenta el contenido de ácidos orgánicos, que reduce la alcalinización y contribuye a la homeostasis del pH citosólico. Además, el OAA producido por la PEPC puede ser usado por la lanzadera OAA/malato mitocondrial o cloroplástica para transportar hasta el citosol el poder reductor requerido por la nitrato reductasa (NR) (Oaks 1994). Finalmente se observa una clara relación entre la actividad PEPC y la actividad glutamina sintetasa (GS), estando esta última controlada por los niveles de glutamina (Dever et al. 1995) y la expresión de la PEPC coordinada con la NR (Müller et al. 2001). Todo esto pone en evidencia una coordinación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno finamente regulada para mantener una adecuada relación C/N.

Los cambios en el reparto del carbono en el punto de ramificación del PEP, son cruciales para permitir a las células vegetales sincronizar su metabolismo con las variaciones de las condiciones ambientales.

### 1.5.2. Regulación de la actividad PEPC

Su actividad y expresión guardan relación con la situación metabólica de la raíz. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la presencia de alta concentración de nitrato aumenta el flujo de carbono hacia la PEPC para suministrar esqueletos carbonados al ciclo de Krebs (Álvarez et al, 2005). Esto repercute en el balance de C/N de la planta, disminuyendo la cantidad de carbono disponible para ser acumulado, lo que en órganos de reserva (Jeanneau et al. 2002) sería perjudicial para la producción.

La PEPC también está regulada por estrés y por ABA. En el caso de las plantas  $C_3$ , se ha detectado que el estrés salino y el ABA aumentan la actividad PEPC en *Hordeum vulgare* (Popova et al. 1995). También se ha visto aumento de expresión de la PEPC en raíces de plántulas de trigo en tratamientos con LiCl, NaCl, hipoxia o bajas temperatura (González et al. 2003; Monreal et al. 2007).

Finalmente, hormonas como las citoquininas, en conjunción o no con la nutrición nitrogenada, pueden modificar la expresión de la PEPC (Peters et al. 1997).

#### Regulación postraducciona

Todas las PEPCs muestran propiedades alostéricas: Las PEPCs de plantas vasculares son típicamente inhibidas por L-malato y activadas por Glu-6-P. Además, Asp y Glu son inhibidores alostéricos de PEPCs de tejidos activos en la asimilación de nitrógeno y/o reacciones de transaminación, proporcionando así un vínculo entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Law & Plaxton 1997; Moraes & Plaxton 2000; Blonde & Plaxton 2003). También está bien establecido que la actividad de la PEPC en la mayoría de plantas vasculares está controlada por fosforilación reversible catalizada por una proteína quinasa endógena independiente de  $Ca^{2+}$  y desfosforilada por proteínas fosfatasa tipo 2 (PP2A) en un residuo de serina en el extremo N-terminal altamente conservado (Chollet et al. 1996; Izui et al. 2004; Nimmo 2003). Esto normalmente da como resultado la reducción de la sensibilidad de la enzima a la inhibición por malato y un aumento de la sensibilidad a la activación por Glc-6-P (Tripodi et al. 2005).

Generalmente, las PEPCs de dicotiledóneas son activadas por **glucosa 6-fosfato** (Glu-6-P) e inhibidas por **L-malato o aspartato**, especialmente a **pHs subóptimos** (del orden de 7,1 a 7,3) que se aproximan al valor de pH citosólico (Andreo et al. 1987; Echevarría et al. 1994). La Glu 6-P aumenta la  $V_{max}$  de la PEPC, produciendo una bajada de la  $K_m$  para el PEP y reduciendo la sensibilidad de la enzima al L-malato. El pH óptimo de la enzima es de 8. In vivo, la actividad de la enzima va a depender del balance entre los efectores negativos y positivos relacionados con la fotosíntesis y de la modulación por el pH citosólico (Gilioli-Guivarc'h et al. 1996). La mayoría de factores que interaccionan y actúan en la regulación de la PEPC (pH, glucosa, fosforilación) son opuestos al efecto negativo ejercido por el L-malato (Jeanneau et al. 2002).

Para la PEPC bacteriana, además de no poseer dominio de fosforilación en el extremo N-terminal, como se ha indicado anteriormente, presenta propiedades cinéticas diferentes, que han sido determinadas en BTPC recombinantes: una disminución importante de sensibilidad a los efectores, tanto positivos (Glu-6P, Glu-1P, Fru-6P, Glicerol-3P) como negativos (Malato, Aspartato; presenta una IC<sub>50</sub> 69 veces mayor que la PEPC Clase-1), altamente termoestable (mantiene el 70% de su actividad a 50 °C mientras que la forma PEPC Clase-1 mantiene sólo el 5% (O'Leary et al. 2009). La PEPC Clase-1 es un homotetrámero formado por cuatro subunidades de PTPC (PEPC típica de plantas vasculares).

La regulación de la actividad de la PEPC también está influenciada por el **estado oligomérico** de la enzima, siendo el tetrámero la conformación óptima, seguida del dímero, y con un monómero inactivo. Los cambios en el estado de oligomerización están propiciados por factores como dilución de la enzima, concentración de sales en el medio de ensayo, concentración de L-Malato o baja temperatura (Chollet et al. 1996). Sin embargo, la contribución real de esta regulación a la actividad de la enzima in vivo no está clara en plantas C<sub>4</sub>. Por el contrario, en plantas CAM hay evidencias de que el tetrámero actuaría durante la fase nocturna asociado a la fase activa de fijación de CO<sub>2</sub> (Chollet et al. 1996). Se ha descrito que los solutos compatibles como el PEG-6000, promueven la oligomerización de la PEPC, incrementando la actividad de la enzima y disminuyendo su sensibilidad al malato (Huber and Sugiyama 1986).

En semillas de ricino (castor oil seed, COS) se ha descrito la existencia de un hetero-octámero formado por cuatro unidades de PEPC Clase-1 (PEPC típica de plantas vasculares) y cuatro unidades de PEPC bacteriana (BTPC) para formar la PEPC de Clase-2. Estos hetero-oligómeros exhiben propiedades físicas, cinéticas y reguladoras alteradas, intermedias entre la PEPC Clase-1 y la BoPC (en cuanto a respuesta a metabolitos reguladores y sensibilidad térmica). Las características cinéticas y regulatorias del complejo PEPC Clase-2 son coherentes con su supuesta función como mecanismo de "desbordamiento metabólico" que podría mantener un flujo significativo de PEP a malato en condiciones fisiológicas que inhibirían gran medida una Clase-1 PEPC (O'Leary et al. 2009).

### **Regulación covalente por fosforilación reversible**

Todas las PTPCs fotosintéticas y no fotosintéticas están sometidas a regulación por fosforilación reversible. La fosforilación es llevada a cabo por una pequeña proteína con actividad quinasa, la PEPC quinasa (PPCK).

En la PEPC fotosintética C<sub>4</sub> de sorgo, la fosforilación duplica la V<sub>max</sub>, aumenta 7 veces la K<sub>i</sub> para su inhibidor, el L-malato y 4,5 veces la K<sub>a</sub> para la Glu-6-P, en condiciones de pH y concentración de PEP subóptimos (Echevarría et al. 1994; Duff & Chollet 1995).

La isoenzima no fotosintética también está sometida a una regulación por fosforilación reversible, similar a la de las isoenzimas C<sub>4</sub> o CAM (Chollet et al. 1996; Vidal & Chollet 1997;

Gousset-Dupont et al. 2005). Diversos estudios con  $^{32}\text{P}$  han demostrado la existencia de fosforilación reversible en una gran variedad de tejidos donde sólo se localiza la isoenzima no fotosintética, como nódulos de raíces de soja (Zhang et al. 1995) semillas de trigo, cebada y sorgo (Osuna et al. 1996; Feria et al. 2008; Ruiz-Ballesta et al. 2014) y frutos (Law & Plaxton 1997).

En hojas  $\text{C}_3$  de *Arabidopsis*, mediante experimentos de marcaje radiactivo con  $^{32}\text{P}$ , se detecta PEPC marcada en extractos de luz y no de oscuridad. Esto apoya la hipótesis de que los cambios dependientes de la luz en las propiedades regulatorias de la PEPC se deben a la fosforilación in vivo de la enzima (Gousset-Dupont et al. 2005). Como se ha propuesto en el caso de la PEPC  $\text{C}_4$ , la fosforilación podría ejercer un efecto protector que contrarrestaría la inhibición metabólica de la PEPC.

En el caso de las plantas  $\text{C}_3$  la PEPC juega un papel crucial en el metabolismo del carbono y el nitrógeno. Por lo tanto el papel de la fosforilación reversible en oposición a la inhibición metabólica de la PEPC de  $\text{C}_4$  y CAM, puede aplicarse a cualquier contexto fisiológico donde la concentración de metabolitos sea alta; en el caso de la PEPC  $\text{C}_3$ , durante el flujo anaplerótico del carbono (Jeanneau et al. 2002).

La fosforilación de la PEPC es llevada a cabo por una proteína quinasa específica (PPCK). Han sido identificados diferentes elementos que activan la síntesis de la PPCK:

- La luz, en el caso de las plantas  $\text{C}_4$  (Pierre et al. 1992; Giglioli-Guivarc'h et al. 1996; Coursol et al. 2000; Echevarría & Vidal 2003; Osuna et al. 2004).
- El ritmo circadiano en las plantas con metabolismo CAM (Nimmo 2003)
- El malato disminuye la actividad PPCK, en tabaco (Nimmo 2003)
- Los fotosintatos traslocados, produciendo una PEPC fosforilada cuando mayor aporte de fotosintatos hay, en nódulos de soja (Nimmo, 2003)
- El déficit de fosfato aumenta la PEPC y la PPCK (Gregory et al. 2009).
- La luz en hojas  $\text{C}_3$  de tabaco, por una ruta diferente de la seguida en el caso de las PEPC  $\text{C}_4$  (Li 1996). Y la luz también aumenta la PK en protoplastos de mesófilo de cebada (Smith et al. 1996).
- La relación Glu-6-P/L-malato en el desarrollo y germinación de semillas de cebada (Feria et al. 2008).
- La PPCK desaparece tras cortar el flujo de fotosintatos en semillas de cebada, ricino y soja, por eliminación de la espiga u oscuridad prolongada (Xu et al. 2003; Sullivan et al. 2004; Tripodi et al. 2005; Murmu & Plaxton 2007; Feria et al. 2008; O'Leary et al. 2011).
- Un aumento de la PPCK en plantas de sorgo sometidas a estrés salino. El estrés salino es capaz de aumentar la actividad PPCK y la fosforilación de la PEPC independientemente de la activación por luz (Echevarría et al. 2001; García-Mauriño et al. 2003; Monreal et al. 2007).

### Regulación por monoubiquitinación

La ubiquitina (Ub) es una pequeña proteína globular de 76 aminoácidos que aparece en todos los eucariotas y que está implicada en la regulación de múltiples procesos celulares. Además de en la proteólisis celular (Hershko & Ciechanover 1998), la Ub también participa en el ciclo celular, replicación, transcripción y reparación del ADN y de la endocitosis y en la interacción proteínas-direccionamiento a membranas o compartimentos celulares (Mukhopadhyay & Riezman 2007).

La Ub puede modificar a las proteínas de diversas formas, determinando su destino celular o su función:

- Monoubiquitinación: Un sola Ub se une a la proteína. Regula la reparación de ADN, la expresión génica y la endocitosis
- Multiubiquitinación: Varias Ub se unen a lugares diferentes de la proteína. Regula receptores de la endocitosis.
- Poliubiquitinación: Unión de varias Ub unidas a un único lugar de la proteína sustrato. Puede ser ramificada o lineal.

El tipo de ubiquitinación y el lugar de unión a la proteína determina diversas funciones: marcaje para ser degradado en el proteosoma, tolerancia a daños en el ADN, transducción de señales o activación de factores de transcripción (Sadowsky et al. 2012).

La degradación de la PEPC y la PPCK son mediadas por la poliubiquitinación y el proteosoma (Agetsuma et al. 2005; Monreal et al. 2007).

En 2008 fue descrito el primer ejemplo de regulación por monoubiquitinación en una enzima metabólica de plantas en la PEPC (Uhrig et al. 2008). Recientemente se ha detectado la monoubiquitinación de la PEPC en raíces inmaduras con proteoide de *Hakea próstata* (Shane et al. 2013). La monoubiquitinación en PEPC en estas plantas tiene un efecto inhibitorio ya que aumenta la  $K_m$  (PEP) y la sensibilidad de la enzima a los inhibidores alostéricos. Estos estudios han proporcionado un nuevo modelo de control postraducciona en la PEPC no fotosintética (Downes & Vierstra 2005; Schenell y Hicke, 2003).

La existencia de una doble banda de PEPC altamente reminiscente a la ubiquitinación, ha sido frecuentemente identificada en extractos clarificados de diferentes plantas, incluyendo hojas C3, células de la guarda, raíces y frutos (Denecke et al. 1993; Law & Plaxton 1997; De Nisi & Zocchi 2000; Rao et al. 2006), y durante el desarrollo y germinación de la semilla de cereales, como en trigo, cebada y sorgo (Osuna et al. 1996; González et al. 1998; Nhiri et al. 2000; Feria et al. 2008; Ruiz-Ballesta et al. 2014).

Aún está en estudio los contextos fisiológicos en los que las plantas utilizan este mecanismo de regulación y como interactúa la monoubiquitinación de la PEPC con el resto de mecanismos de regulación de la enzima.

### 1.5.3. PEPC y temperatura

Se conoce que la PEPC  $C_4$  es marcadamente regulada por la luz y por la temperatura. Los efectos individuales de la luz y la temperatura han sido ampliamente estudiados (Chinthapalli et al. 2003; Izui et al. 2004; Pierre et al. 2004).

Se han comparado las propiedades de la PEPC en discos foliares de plantas  $C_4$  (*Amaranthus hypochondriacus*) y  $C_3$  (*Pisum sativum*) en respuesta a la temperatura, comprobando que este factor causa importantes fenómenos de modulación, con patrones diferentes en las plantas  $C_4$  a los de las  $C_3$ . En las plantas  $C_4$ , la PEPC muestra una  $T^a$  óptima in vitro de 45 °C frente a los 30 °C en las plantas  $C_3$ , a bajas  $T^a$  (15 °C) la PEPC  $C_4$  perdió mayor actividad (70% de pérdida) que la PEPC  $C_3$  (35%); el aumento de temperaturas entre 15 °C y 50 °C produjo una importante disminución de la sensibilidad al efector negativo L-malato con mayor alcance en las plantas  $C_4$  (45%) que en las  $C_3$  (30%). En ambos tipos de plantas los efectos de la temperatura eran en gran medida reversibles y no se mostraban asociados a diferencias en el grado de fosforilación. La adición de solutos compatibles (PEG-6000) amortiguó la modulación por temperatura de la sensibilidad de la PEPC al malato en *A. hypochondriacus* lo que sugiere que las diferencias encontradas pueden deberse a cambios conformacionales significativos en la PEPC  $C_4$  producidos por la temperatura (Chinthapalli et al. 2003).

También ha sido descrito in vivo, en *Amaranthus hipocondriacus*, una modulación positiva en función de la temperatura y la iluminación, mayores temperaturas y radiación aumentan la actividad PEPC en hojas, su sensibilidad a la Glu-6P y disminuye su sensibilidad al málico (Avasthi et al. 2011)

### 1.5.4. Metabolismo y niveles de nucleótidos de adenina

Los niveles metabólicos de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) son distintos en diferentes situaciones metabólicas. Se han empleado diversos índices relacionados con la cuantificación de adenilatos para estimar el estado metabólico de la planta o de parte de ella, en distintas situaciones. Los nucleótidos de adenina no son sólo indicadores de la actividad celular, sino que además regulan esta actividad. Al ser el ADP, junto con el  $O_2$ , el sustrato para la síntesis de ATP, la disponibilidad de ADP puede regular la velocidad de la respiración mitocondrial y en general todo el metabolismo respiratorio de los carbohidratos. La tasa de ATP/ADP se ha descrito como uno de los principales indicadores y reguladores del estado energético de la célula (Schultz et al. 1993). Las semillas en germinación presentan altos valores de ATP/ADP (Ching & Kronstand 1972) y en las raíces (Adams 1970) y tejidos verdes (Bukhov et al. 1995) se han encontrado bajos niveles. En el caso de las raíces de remolacha en condiciones de siembra otoñal se ha caracterizado la evolución de los nucleótidos de adenina, y se ha comparado con lo que sucede en la siembra primaveral. En la época de recolección de la remolacha de siembra primaveral, los patrones del contenido en adenilatos se

corresponden con la fase de latencia, indicando una baja actividad metabólica, con altos niveles de ATP y de ADP. En cambio, la remolacha de siembra otoñal en la época de recolección, presenta una alta actividad metabólica, con altos niveles de prolina, glucosa y alta tasa respiratoria (bajos niveles de ADP). La combinación de un metabolismo respiratorio activo, que permite el catabolismo de carbohidratos y la síntesis de moléculas para el estrés, con las condiciones climáticas en el momento de la cosecha, podrían ser los mecanismos fisiológicos subyacentes que causan diferencias en las cosechas en los dos tipos de siembra (García-Mauriño et al. 2005).

## 1.6. OBJETIVOS

---

- 1) Establecer las consecuencias de los golpes de calor en la remolacha de siembra otoñal a nivel fisiológico y agronómico.
- 2) Profundizar en las causas de las pérdidas de producción y calidad producidas por los golpes de calor.
- 3) Determinar las consecuencias fisiológicas de los golpes de calor en los diferentes momentos de desarrollo del cultivo (abril, mayo, junio, julio), a través del estudio de parámetros fisiológicos como actividades enzimáticas degradativas de la sacarosa y de la actividad PEPC.
- 4) Diferenciar las respuestas fisiológicas del estrés térmico, hídrico y la combinación de los dos estreses. Estudios de los niveles de prolina.
- 5) Establecer indicadores del nivel de estrés de la remolacha de siembra otoñal y plantear posibles medidas para reducir los efectos negativos de los golpes de calor en el cultivo.





## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **2.1. CONDICIONES DEL CULTIVO EN LOS ENSAYOS DE CAMPO**

---

### **2.1.1. Material vegetal y condiciones de manejo**

Se ha estudiado la fisiología y el metabolismo de *Beta vulgaris* desde los periodos en los que comienzan a elevarse la temperatura en Andalucía (marzo-abril) hasta la fecha de recolección, durante las campañas agrícolas 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 (1ª, 2ª y 3ª campaña).

Las muestras utilizadas para los ensayos fueron sembradas y cosechadas por AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera). El material vegetal para los ensayos es la variedad Dax (casa comercial Strube). La parcela de ensayo estaba ubicada en la finca “Hato Ratón” (Aznalcázar, Sevilla) seleccionada por sus excepcionales valores de calidad y producción. Las condiciones de manejo de las parcelas de ensayo han seguido las especificaciones recomendadas por AIMCRA, que son las que se siguen en el total de la finca.

Los ensayos diseñados fueron variando en cada campaña en función de los resultados obtenidos en la campaña anterior, encaminados a obtener respuestas sobre el efecto del estrés térmico e hídrico en el periodo de enriquecimiento de la raíz en *Beta vulgaris*.

### **2.1.2. Descripción del diseño de muestreo básico**

Los ensayos realizados para este estudio se situaron sobre remolachas que estaban en producción en la finca Hato Ratón, donde las remolachas se manejaron según las recomendaciones de cultivo de AIMCRA para aquellos parámetros que no eran objeto de estudio. El estudio se hizo mediante un Diseño de Bloques Incompletos al Azar. En cada muestreo se recolectaba 0,5 m<sup>2</sup> (1 metro lineal) en las zonas adyacentes del muestreo anterior para cada tratamiento. En la recolección se tomaban remolachas completas (hojas+raíz principal). Para el estudio fisiológico se tomaron tres remolachas completas al azar para cada condición y para el testigo. Se efectuaron arranques mensuales o quincenales según el ensayo y el arranque en recolección (julio).

### **2.1.3. Diseño de los ensayos de campo realizados en cada campaña (2004-2005, 2005-2006, 2006-2007)**

La selección del material vegetal y la preparación de las parcelas de muestreo fueron realizadas por AIMCRA. El diseño y las características de los ensayos fueron determinados conjuntamente por AIMCRA, el grupo de Ecofisiología de la Universidad Pablo de Olavides y el grupo de Fisiología Vegetal de la Universidad de Sevilla.

### 2.1.3.1. Campaña agrícola 2003-2004. (1ª campaña)

En esta campaña se realizaron dos ensayos diferentes:

#### 1. Ensayo térmico

Para la creación de condiciones diferenciales de temperatura en el cultivo, y por las previstas altas temperaturas alcanzables (según indicación del instalador) se instalaron 2 túneles de plástico transparente de 8m x 21m cada uno (Fig. M.1), abiertos en los extremos, el día 13/04/04 (Tabla M.1). Se comprobó la transparencia del plástico utilizado, siendo la radiación interior un 75% de la radiación exterior. En las fechas del muestreo (abril-julio), la radiación máxima en el interior del túnel superaba los  $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En la bibliografía se considera  $800\text{-}1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  como valor de saturación para la remolacha (Brown & Rosenberg 1970; Soffe 2003)

Se contaba así con tres tratamientos:

- Control: exterior de túnel
- Sin ventilación: túnel completo
- Ventilado: túnel con ventanas laterales para crear situación intermedia entre las condiciones anteriores.

El cultivo fue mantenido en riego por aspersión hasta la instalación de los túneles, y por goteo hasta el 7/07/2004, siendo la cantidad de agua suministrada la indicada por el balance de agua (ETc) (Evapotranspiración del cultivo) (Allen et al. 1998).



**Figura M.1.** Montaje y distribución del ensayo con túneles grandes durante la 1ª campaña.

## 2. Ensayo con inhibidores de invertasas

Para los ensayos con inhibidores de invertasas se utilizaron las remolachas sometidas a las condiciones control. Se realizaron dos repeticiones del ensayo consistentes en dos ejemplares cada una cuyas hojas y corona fueron rociadas con 2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxipirrolidina (DMDP) 10  $\mu$ M, una sustancia inhibidora de la actividad invertasa el 19/07/04, una semana antes y el día antes de la obtención de las muestras de la obtención de las muestras.

**Tabla M.1.** Fechas de siembra, muestreos y aplicación de tratamientos en la 1ª campaña.

	Evento	Fecha	Remolachas
	Siembra	20/11/2003	
<b>ENSAYO TÉRMICO</b>	Colocación túnel	13/04/2004	
	Muestreo 1	19/04/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 2	04/05/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 3	17/05/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 4	31/05/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 5	07/06/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 6	14/06/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 7	28/06/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Último riego	08/07/2004	
	Muestreo 8	12/07/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar
	Muestreo 9	26/07/2004	3 control, 3 Túnel ventilado, 3 Túnel sin ventilar

### 2.1.3.2. *Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña)*

En esta campaña se realizaron tres ensayos:

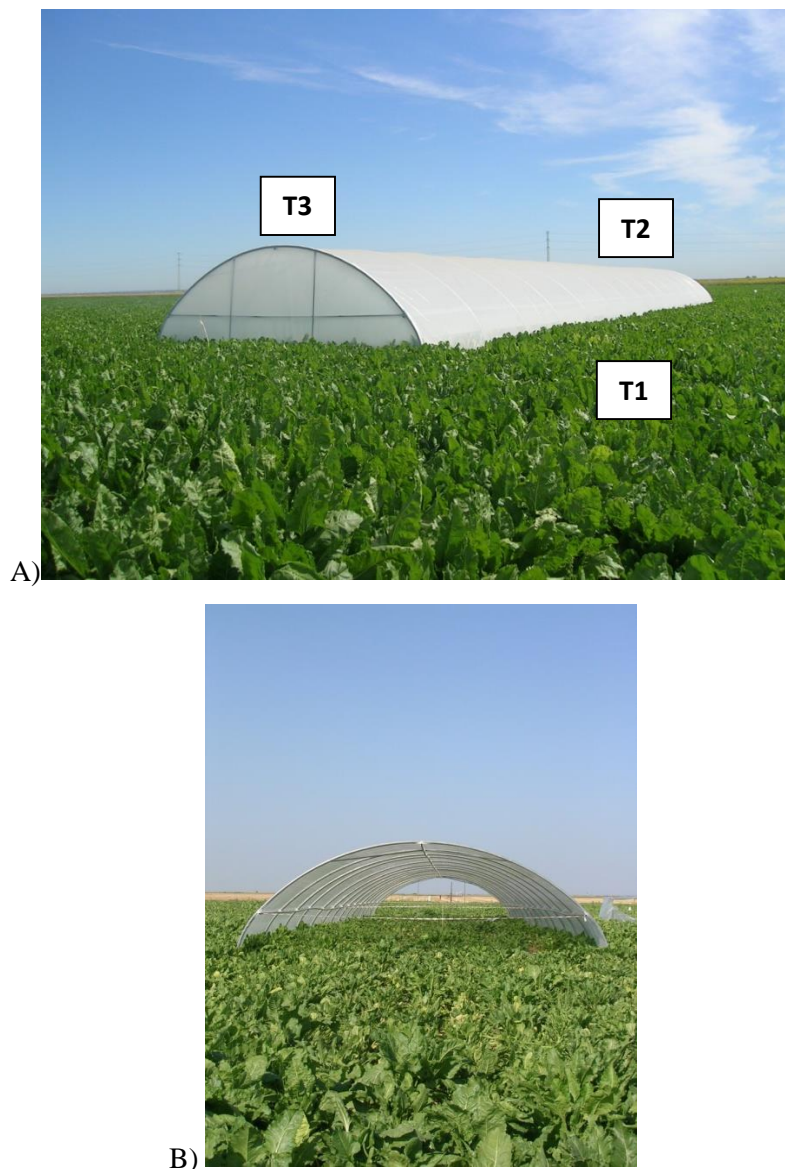
#### 1. Ensayo térmico: Túnel grande

Durante esta campaña se instaló un solo túnel de 8 m x 42 m, cerrado en un extremo para la creación de condiciones diferenciales de temperatura. Se cerró el extremo más expuesto a los vientos dominantes para disminuir las turbulencias y la refrigeración en el interior del túnel (Fig. M.2). El túnel fue colocado el día 20/03/05. Se mantuvo cerrado hasta alcanzar temperaturas extremas para el cultivo que amenazaban la viabilidad de la planta y del experimento, con una diferencia de

temperatura significativa respecto al exterior (15° C, 44° C en el interior, 29° C en el exterior). Tras este estrés de choque, se destapó el extremo cerrado (14 de abril, Tabla M.2) y se mantuvo el túnel hasta la recolección en julio. En este ensayo se diferenciaron tres condiciones:

- T1. Control: Ausencia de túnel, remolachas del exterior, de la zona colindante al túnel.
- T2. Estrés moderado: Zona del túnel desde el centro al extremo abierto.
- T3. Estrés severo: Zona del túnel desde el centro, al extremo cerrado.

El cultivo fue mantenido en riego por aspersión hasta la instalación de los túneles, y por goteo hasta el 11 de julio (penúltimo muestreo). La cantidad de agua suministrada fue la indicada por el balance de agua, ETc (Evapotranspiración del cultivo) (Allen et al. 1998)



**Figura M.2.** Montaje del túnel tapado (A) y destapado (B) durante la 2ª campaña.

## 2. Ensayo térmico: Microtúneles

En este ensayo, que se ha denominado “golpe de calor en microtúneles”, se diseñó un modelo de microtúneles portátiles que permitió someter a las remolachas a golpes de calor puntuales en diferentes estadios de desarrollo. Se realizaron dos ensayos de golpe de calor uno en el mes de junio y otro en el mes de julio. En cada ensayo, se colocaron 3 microtúneles (3 repeticiones) de plástico transparente de 3 m x 2 m x 1,80 m, colocando el microtúnel durante dos semanas (Fig. M.3). Tras estas dos semanas se recolectó la mitad de la superficie y el resto de plantas se mantuvieron sin la cobertura de plástico hasta la recolección de julio. Esto permitiría evaluar el efecto inmediato del golpe de calor y el efecto a largo plazo.

Se obtuvieron así dos condiciones para el efecto inmediato:

- C: Control, sin microtúnel.
- T: Tratamiento, bajo el microtúnel.

Y otras dos muestras en el momento de recolección para cada fecha:

- Control en recolección.
- Tratamiento en recolección.

Las condiciones de riego permanecieron idénticas al ensayo anterior.



**Figura M.3.** Disposición de los microtúneles para los golpes de calor de 15 días y de las plantas utilizadas como control en este ensayo. De cada estructura se recogía una planta para tener tres repeticiones independientes.

## 3. Ensayo hídrico

En paralelo a los ensayos de golpe de calor en túneles y microtúneles se realizó un tercer ensayo en el que el factor cambiante fue la restricción hídrica (Fig. M.4). Las parcelas estaban separadas



entre ellas para evitar flujos de agua de unas parcelas a otras. Se realizaron tres condiciones diferentes de aporte hídrico:

- Control: Riego recomendado (según ETc).
- 60%. Suministro del 60% de la cantidad de agua recomendada.
- Secano: Ausencia de riegos.



**Figura M.4.** Esquema del ensayo de riego restringido realizado durante la segunda campaña.

**Tabla M.2.** Fechas de siembra, muestreos y condiciones de manejo de los ensayos durante la segunda campaña.

	Eventos	Fecha	Remolachas
	Siembra	25/10/2004	
ENSAYO TÉRMICO	Colocación túnel	20/03/2005	
	Muestreo 1	04/04/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Apertura túnel	14/04/2005	
	Muestreo 2	18/04/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 3	03/05/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 4	16/05/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 5	30/05/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 6	13/06/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 7	27/06/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 8	11/07/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Ultimo riego	11/07/2005	
	Muestreo 9	25/07/2005	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Colocación 1º microtúnel	01/06/2005	
	Recolección 1º microtúnel	16/06/2005	3 Control, 3 microtúnel



ENSAYO GOLPES DE CALOR	Colocación 2º microtúnel	20/06/2005	
	Recolección 2º microtúnel	05/07/2005	3 Control, 3 microtúnel
ENSAYO HÍDRICO	Muestreo 1	03/05/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 2	16/05/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 3	30/05/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 4	13/06/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 5	27/06/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 6	11/07/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 7	25/07/2005	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano

### 2.1.3.3. *Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña)*

Se repitieron los ensayos de la campaña anterior con algunas variaciones:

#### 1. **Ensayo térmico: Túnel grande**

Se reprodujeron las condiciones con un solo túnel, colocado el 3/04/2006 y abierto el 19/05/2006 (Tabla M.3). Se alcanzaron diferencias en las temperaturas máximas del interior del túnel y del exterior de 10°C (47°C interior, 37° C exterior)

#### 2. **Ensayo térmico: Microtúneles**

Se realizaron siguiendo el mismo patrón que en la campaña anterior, pero tras los resultados de la campaña anterior, se determinó la necesidad de colocarlos en cuatro fechas: abril, mayo, junio y julio. Se tomaron muestras tras dos semanas de tratamiento y en recolección al igual que en la campaña anterior (Tabla M.3).

#### 3. **Ensayo hídrico**

Se repitió el ensayo de restricción hídrica, con idénticas condiciones a la campaña anterior.

**Tabla M.3.** Fechas de siembra, muestreos y condiciones de manejo de los ensayos durante la tercera campaña.

	Eventos	Fecha	Remolachas
	Siembra	09/12/2005	
<b>ENSAYO TÉRMICO</b>	Colocación túnel	03/03/2006	
	Muestreo 1	18/04/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 2	02/05/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 3	15/05/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Apertura túnel	19/05/2006	
	Muestreo 4	31/05/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 5	12/06/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 6	26/06/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 7	10/07/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
	Muestreo 8	24/07/2006	3 control, 3 exterior túnel, 3 interior túnel
<b>ENSAYO GOLPES DE CALOR</b>	Colocación 1° microtúnel	11/04/2006	
	Recolección 1° microtúnel	26/04/2006	3 Control, 3 microtúnel
	Colocación 2° microtúnel	08/05/2006	
	Recolección 2° microtúnel	23/05/2006	3 Control, 3 microtúnel
	Colocación 3° microtúnel	05/06/2006	
	Recolección 3° microtúnel	20/06/2006	3 Control, 3 microtúnel
	Colocación 4° microtúnel	02/07/2006	
	Recolección 4° microtúnel	17/07/2006	3 Control, 3 microtúnel
<b>ENSAYO HÍDRICO</b>	Muestreo 1	31/05/2006	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 2	12/06/2006	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 3	26/06/2006	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 4	10/07/2006	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano
	Muestreo 5	24/07/2006	3 Riego, 3 Riego 60% CR, 3 Secano

## 2.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS

---

Se registraron la temperatura y humedad relativa en las diferentes condiciones de ensayo con registradores en continuo HOB0 (modelo U12-13; marca Onset) y una frecuencia de 30 minutos. Estos sensores fueron instalados y chequeados por AIMCRA y por el grupo de la UPO. Estos sensores aportaron los datos de temperatura (máxima, media y mínima) y humedad (relativa y total, máxima y mínima).

Para los datos generales de la información climática se ha recurrido a la red de estaciones agroclimáticas de la Consejería de Agricultura Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, tomando los datos de la estación meteorológica de Aznalcázar, situada en el interior de la propia finca (código de la estación: 5). Estos datos se han utilizado para obtener la radiación solar, la velocidad y dirección del viento y la precipitación. Estos datos se han utilizado para las correlaciones y también para la obtención de una ETo contextualizada para nuestros ensayos (EToC). Dentro de los túneles, el viento no se tuvo en cuenta para el cálculo mientras estaban cerrados pero se incluyó al abrirlos. El aporte hídrico fue calculado según la demanda ETo del cultivo.

Los gráficos de la evolución de los parámetros climáticos del exterior y del interior de los túneles se han recogido en los capítulos de los resultados 3.1 sobre la influencia de los túneles y los parámetros climáticos y 3.6 sobre el efecto de los microtúneles.

### 2.3. TOMA DE MUESTRAS, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN

---

La evolución de los distintos parámetros fisiológicos se siguió a través de muestreos quincenales comenzando en abril en las tres campañas (19-04-18 de abril respectivamente en 2004-2005-2006, Tablas M.1, M.2, M.3), para el ensayo térmico. En el caso de los microtúneles se tomaron muestras tras 15 días de permanencia de los microtúneles, el 20 de junio y el 5 de julio en la 2º campaña. Las remolachas restantes de los dos ensayos de microtúneles se recolectaron el 25 de julio. Durante la tercera campaña (2006) se realizaron cuatro ensayos con microtúneles, recolectando tras 15 días de tratamiento en las siguientes fechas: 26 de abril, 23 de mayo, 20 de junio, 17 de julio. Las remolachas restantes se recolectaron el 18 de julio. Los ensayos hídricos se han seguido con muestreos quincenales desde el 3 de mayo al 25 de julio en la segunda campaña (Tabla M.2) y desde el 31 de mayo al 21 de julio en la tercera campaña (Tabla M.3).

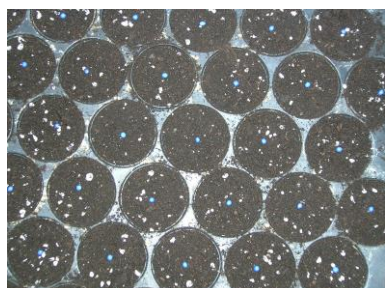
De cada muestreo se tomaron tres plantas de cada una de las condiciones. La recogida se realizó manualmente a primera hora de la mañana (de 8 a 11). Las plantas enteras fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente en un periodo máximo de dos horas. El material vegetal fue separado en raíz acumuladora, peciolo y limbo. Las raíces acumuladoras fueron lavadas para eliminar restos de barro. Una mitad de la raíz era picada con una picadora moulinex y mezclada con las porciones de las otras dos raíces de la muestra. De este preparado se separaban tres porciones, que eran introducidas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Estas muestras se utilizaron para las determinaciones enzimáticas, glucosa, prolina y proteínas. De las otras mitades de las raíces se sacaron, con un sacabocados, muestras de raíz que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y conservadas luego a -35 °C hasta su utilización para la determinación de adenilatos. Para las determinaciones en hojas, de cada planta se seleccionaban tres hojas, la 4ª, 5ª y 6ª (completamente extendidas) desde el centro de la roseta. Los peciolo y limbo eran separados, picados y homogeneizados con las otras réplicas. Inmediatamente se sumergían en N<sub>2</sub> líquido. Todas las muestras se conservaron a -35 °C hasta el momento de los ensayos.

Para los ensayos en condiciones controladas se contó también con tres repeticiones para cada condición que se procesaban de igual forma que las plantas recepcionadas del cultivo.

## 2.4. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Paralelamente a los ensayos de campo, se realizaron diversos ensayos en condiciones controladas en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

La germinación y crecimiento de las plantas se realizó en cámara de cultivo con una temperatura constante de 26° C, 12 horas de fotoperiodo y una humedad relativa constante del 50%. Antes de los tratamientos, las plantas se mantenían en estas condiciones al menos durante 40 días. Las plantas eran germinadas en semilleros en tierra para los cultivos en tierra y en vermiculita para los cultivos en otros sustratos. A los 10 días (o cuando los dos cotiledones se habían desplegado completamente) eran trasplantadas al sustrato definitivo. En la figura M.5 se muestran los diferentes estadios de desarrollo de las plantas cultivadas en el laboratorio.



Plantación



9 días



13 días



22 días



42 días



47 días

**Figura M.5.** Desarrollo de las plantas crecidas en el laboratorio para los ensayos de condiciones controladas en cámara de cultivo. Se muestra la edad de las plantas.

Las plantas crecidas en medios inertes (vermiculita, perlita) eran regadas con medio nutritivo. Según el tipo de ensayo se utilizaron diferentes tipos de sustratos para el crecimiento de las plantas:

**Sustrato: Tierra vegetal**

Las plantas eran trasplantadas a macetas de plástico de 2,5 litros con una mezcla de tierra vegetal y un 10% en volumen de perlita para un adecuado drenaje. El aporte hídrico era suministrado a mano con agua de la red de abastecimiento cuando la superficie de la maceta dejaba de estar húmeda.

**Sustrato: Hidropónico en perlita o vermiculita**

Las plantas eran trasplantadas a macetas de plástico de 2,5 litros con perlita o vermiculita. El aporte hídrico y de nutrientes era suministrado a mano con medio de cultivo tipo Hewit (1966) con la siguiente composición:

MACRONUTRIENTES	Concentración final (mM)	MICRONUTRIENTES	Concentración final (mM)
KNO <sub>3</sub>	5	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10 <sup>-2</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 <sup>-3</sup>
SO <sub>4</sub> Mg·7H <sub>2</sub> O	0,2	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	5 10 <sup>-4</sup>
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na·2H <sub>2</sub> O	1,34	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 <sup>-3</sup>
		BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	5 10 <sup>-2</sup>
		CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 10 <sup>-4</sup>
		ClNa	1
		FeNa-EDTA	0,1

**Sustrato: Hidropónico en medio líquido**

Las plantas eran trasplantadas a macetas de plástico de 2,5 litros con el interior forrado de plástico y rellenas de medio nutritivo tipo Hewit (1966). Las plántulas se mantenían en flotación con un soporte de poliestireno expandido fabricado para tal efecto. Este soporte tenía abertura para la plántula y para el tubo de aireación no permitiendo la entrada de luz al medio para evitar la contaminación por algas. En la figura 6 se muestra un ejemplo del montaje de las plantas en cultivos hidropónicos.

Las plántulas pasaban de la vermiculita al medio hidropónico donde permanecían sin aporte de O<sub>2</sub> por burbujeo una semana. A la semana se instalaba el sistema de aireación para las raíces (Fig. M.6). El medio era rellenado cuando era necesario y sustituido totalmente tanto el medio como los plásticos cada semana.



Plántulas recién trasplantadas a los cultivos hidropónicos.



Plantas en crecimiento en hidropónicos con el sistema de aireación instalado.

**Figura M.6.** Ejemplo de la estructura y montaje de los cultivos hidropónicos de las remolachas en cámara de cultivo.

## 2.5. TRATAMIENTOS SUMINISTRADOS A LAS PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO

---

A continuación se explicará detalladamente la metodología que se siguió para aplicar los diferentes tratamientos a los que se sometieron las plantas bajo las condiciones de cultivo controlado.

### 1. Generación de déficit hídrico

Para producir respuestas al estrés hídrico en las plantas ensayadas se siguieron diversos métodos en función de los medios de cultivo empleados:

#### - **Cultivo en tierra vegetal:**

Las plantas que iban a ser procesadas como “tratamiento” se dejaban de regar durante 4 y 8 días antes de recolectar los órganos a ensayar.

#### - **Cultivo en perlita regada con medio nutritivo:**

Las plantas que iban a ser procesadas como “tratamiento” se dejaban de regar durante 1,6 u 8 días antes de recolectar los órganos a ensayar.

### 2. Generación de estrés térmico

El estrés térmico se generó utilizando una segunda cámara de cultivo que permitía un control más preciso y temporalizado de la temperatura y la humedad. Las plantas sometidas a choque térmico recibían diferentes periodos a 40°C y 55% de humedad, manteniéndose un fotoperiodo de 12 horas. Fueron muestreados diferentes órganos y ensayados diferentes parámetros en plantas cultivadas en perlita y en tierra. La evolución de los diferentes parámetros en las hojas se siguió cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos. Tanto las hojas como las raíces fueron ensayadas a los 30 minutos, 6 horas y 72 horas.

Cuando el estrés generado era sólo térmico, las plantas fueron mantenidas en condiciones óptimas de riego.

### 3. Generación de estrés hídrico y térmico combinado.

Para los ensayos de estrés térmico e hídrico combinado se utilizaron plantas crecidas en perlita bien regadas. La restricción hídrica ligera se produjo mediante tres días sin riego. Posteriormente estas plantas se sometieron a aumentos de temperatura a 40 °C durante un máximo de 6 horas.



## 2.6. DETERMINACIONES DE METABOLITOS, PROTEÍNAS Y CONTENIDO HÍDRICO

---

### 2.6.1. Determinación de proteínas solubles.

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada mediante el método Bradford (1987), a partir de los extractos crudos obtenidos para la determinación de las actividades enzimáticas. La muestra proteica se completó hasta un volumen de 500 µl de agua destilada y se mezcló con 500 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad). Se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas de la muestra se utilizó la curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (Merck) (0 a 10 µg de proteína).

### 2.6.2. Determinación de la glucosa

Para determinar la cantidad de glucosa presente en las muestras se utilizaron los extractos crudos preparados para ensayar las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la sacarosa (IN, IA, SS). La glucosa presente en estos extractos se determinó espectrofotométricamente usando el test de glucosa de Sigma (Glucosa-HK Assay Reagent, producto n° G-3293). Este ensayo se basa en la determinación del incremento de los niveles de NADH como resultado de una reacción acoplada donde participan las enzimas Hexoquinasa y Glc6-P deshidrogenasa en presencia de NAD. En la última oxidación, una cantidad equimolar de NAD es reducida hasta NADH. Se determina el incremento de absorbancia producido a 340 nm. Este incremento es directamente proporcional a la cantidad de glucosa. La recta de calibrado para la glucosa se realizó con una solución estandar de D-Glucosa suministrada por SIGMA (Producto n° G-3285) obteniéndose una recta de regresión entre las dos variables, densidad óptica y glucosa (mg) con un valor de  $r^2=0.99$  ( $p<0.0001$ ).

### 2.6.3. Determinación de la concentración de prolina

#### Extracción:

Para las medidas de prolina se utilizó el método Bates et al (1973), que se basa en el cambio colorimétrico que sufre el ácido de ninhidrina al reaccionar con la prolina. Para ello se homogeneizó 1g de muestra de raíz en un mortero con 10 ml de ácido sulfosalicílico acuoso al 3%. El extracto obtenido se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 min, utilizándose el sobrenadante para las medidas de prolina.

#### Ensayo:

El sobrenadante se mezcló con ácido acético glacial y ácido de ninhidrina en proporción 1:1:1. Se incubó a 100° C durante una hora y tras la adición de tolueno se midió la absorbancia de la fase

acuosa a 517 nm. Este dato se extrapoló a la recta de calibrado realizada previamente a partir de concentraciones conocidas de prolina.

#### **2.6.4. Determinación de la cantidad de adenilatos**

##### **Extracción:**

Los adenilatos se extrajeron homogeneizando las muestras en un mortero con arena y  $\text{HClO}_4$  0,6 N. Tras 30 minutos a temperatura ambiente el homogenado se neutralizó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2 M y se clarificó por centrifugación. Varias alícuotas de cada extracto se conservaron a  $-35^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

##### **Ensayo:**

La determinación de ATP se realizó mediante un ensayo de bioluminiscencia, en el cual se produce una señal luminosa (cuantificable en un luminómetro) que es proporcional a la concentración de ATP en las muestras ensayadas (Bukhov et al. 1995). La determinación de ADP se realizó empleando el mismo método después de su conversión enzimática en ATP (Schultz et al. 1993).

#### **2.6.5. Contenido hídrico y contenido hídrico relativo**

El contenido hídrico (CH) se determinó en algunos casos en hojas y en otras en raíces. Para ello se pesaron 4 discos foliares por planta de  $2\text{ cm}^2$  en el caso de las hojas y 1 gramo de raíz picada en el caso de las raíces. Posteriormente las muestras se secaron a  $70^\circ\text{C}$  hasta peso constante determinando la diferencia correspondiente al agua.

En el caso de las hojas se determinó además el contenido hídrico relativo (CHR). Se determinó en las mismas hojas utilizadas en el resto de determinaciones. Se utilizaron discos foliares de  $2\text{ cm}^2$  de superficie, tomándose 4 réplicas por planta. En cada disco se determinó el peso fresco (PF). Posteriormente, los discos se sumergieron en agua destilada y se mantuvieron a  $10^\circ\text{C}$  durante 12 horas en oscuridad, se secaron y se determinó el peso a máxima turgencia (PT). Las muestras se secaron a  $70^\circ\text{C}$  hasta peso constante y se determinó el peso seco (PS). El CHR se definió como:

$$\text{CHR}(\%) = [(\text{PF} - \text{PS})/(\text{PT} - \text{PS})] * 100$$

## 2.7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

---

### 2.7.1. Extracción de las enzimas:

Se homogeneizaron 0,5 g de muestra en un mortero a 4 °C con arena y los siguientes tampones de extracción:

- Fosfoenolpiruvato carboxilasa: Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 5%, PMSF 1mM, leupeptina 10 µg/ml, quimostatina 10 µg/ml, KF 10 mM, mercaptoetanol 14 mM (Echevarría et al. 1994).
- Invertasas y Sacarosa Sintasa: 50 mM Hepes (pH 7,5), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 10 mM DTT, 2 mM benzamidina, 2 mM N-aminocapronato, 10 mM diethylditiocarbamato (Zhu 1997)

Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 15.000 g a 4 °C y se ensayó el sobrenadante.

### 2.7.2. Determinación de las actividades enzimáticas:

#### 1. Actividad Sacarosa Sintasa (SS)

La determinación de esta actividad se llevó a cabo mediante la utilización de un ensayo acoplado a la piruvato quinasa y a la lactato deshidrogenasa. Se registró la oxidación de NADH mediante determinación espectrofotométrica a 340 nm. La medida se realizó a pH 7,5 (Morell and Copeland 1985).

#### 2. Actividad Invertasa Ácida (IA), Invertasa Neutra (IN)

El extracto crudo se incubó en condiciones saturantes (Schwimmer et al 1961) de sacarosa 120 mM a pH 4,5, para detectar la actividad IA, o a pH 7,5, para detectar la actividad IN. Al cabo de 1 h de incubación la reacción se paró introduciendo los ependorf 2 min a 100° C. La glucosa liberada en la reacción se determinó espectrofotométricamente usando el test de glucosa de Sigma (Glucosa-HK Assay Reagent, producto nº G-3293) según lo descrito en el apartado 2.6.2. La glucosa producida se calculó como la diferencia existente en el extracto crudo tras la incubación (glucosa producida por la enzima) y la glucosa existente en el extracto antes de la incubación (cantidad de glucosa de la muestra) (Zhu et al. 1997). Una unidad de actividad enzimática (U) equivale a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de glucosa por minuto.

#### 3. Actividad Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC)

Para determinar la actividad PEPC en raíz de remolacha se utilizó el ensayo acoplado a la malato deshidrogenasa (MDH) que reduce el oxalacetato producido por la PEPC a L-malato en presencia de NADH. La oxidación del NADH es equimolar a la producción de OAA. La tasa de oxidación de NADH a 340 nm se registra mediante un espectrofotómetro (Modelo Helio  $\alpha$  Thermo Spectronic, uV visible). El medio de reacción contiene tampón HEPES-KOH 0,1 M a pH 8, pH 7,3

o pH 7,1 según el ensayo, PEP 2,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 0,2 mM, 5 U ml<sup>-1</sup> de MDH (Echevarría et al. 1994). El coeficiente de extinción del NADH a 340 nm es 6,23  $\mu\text{moles}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ . El ensayo se inicia con la adición del extracto crudo. Durante el seguimiento de la actividad enzimática el ensayo era mantenido a 30 °C. Una unidad de actividad enzimática (U) corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la carboxilación de 1  $\mu\text{mol}$  de PEP por minuto en las condiciones óptimas de ensayo a pH 8 y 30 °C (Chollet et al. 1996).

#### 4. Determinación del grado de fosforilación de la PEPC mediante la relación entre pHs

La relación entre la actividad determinada a pH óptimo de 8 y a pH subóptimo de 7,3 o 7,1 se toma como una medida del estado de fosforilación de la enzima que está en relación con su estado de activación (Echevarría y Vidal 1997), por lo que se siguió la actividad PEPC de las muestras a pH 8, pH 7,3 y pH 7,1.

Eran utilizados los mismos extractos crudos y el mismo medio de reacción con tampón HEPES-KOH 0,1 M ajustado a los distintos pHs: 8,0; 7,3; 7,1. El pH de los tampones era comprobado y ajustado a temperatura ambiente antes de cada ensayo utilizando un medidor de pH Crison, modelo GLP 21 provisto de un electrodo Crison (Crison Instruments S.A. Alella, España).

Posteriormente era determinada la relación pH8/ pH 7,3 y pH 8/pH 7,1 para cada muestra ensayada.

#### 5. Determinación del grado de fosforilación de la PEPC mediante el grado de activación en presencia de glucosa-6-fosfato (G6P).

El estado de fosforilación de la enzima también puede determinarse midiendo la activación con glucosa-6-P (G6P), efector positivo de la enzima (Echevarría et al. 1994). Se siguió la actividad de la PEPC a los tres pHs ensayados (8,0; 7,3; 7,1) en presencia o ausencia del efector positivo, G6P.

Las cubetas eran preparadas como en los ensayos para determinar la actividad a los tres pHs añadiendo G6P al medio de reacción a una concentración final 4 mM (condiciones saturantes de G6P).

Posteriormente era determinada la activación producida para cada muestra ensayada en presencia de G6P para cada pH ensayado: Actividad pH 8 con G6P/ Actividad a pH 8 sin G6P; Actividad pH 7,3 con G6P/ Actividad a pH 7,3 sin G6P; Actividad pH 7,1 con G6P/ Actividad a pH 7,1 sin G6P.

#### 6. Determinación del grado de fosforilación de la PEPC mediante el test malato.

El grado de fosforilación de la PEPC puede estimarse mediante la sensibilidad de la enzima a su inhibidor alostérico L-malato. El test Malato se basa en la medida de la actividad PEPC en condiciones subóptimas de pH 7,3 en presencia de PEP 2,5 mM y diferentes concentraciones de malato.

En los ensayos de campo, se valoró el % de inhibición de la actividad PEPC en presencia de L-malato a distintas concentraciones: 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM.

En los ensayos en condiciones controladas se calculó la  $IC_{50}$ , que es la concentración de L-malato requerida para inhibir la actividad enzimática al 50%. La  $IC_{50}$  se calculó a partir de una gráfica de la velocidad frente a la concentración de L-malato (Nimmo et al. 1984). En estas condiciones de ensayo, la enzima fosforilada presenta una  $IC_{50}$  para el L-malato de 2 a 3 veces mayor que la enzima desfosforilada (Jiao & Chollet 1991; Bakrim et al. 1992).

#### 7. Medida de la resistencia térmica *in vitro* de la PEPC

Fue medida la resistencia térmica de esta enzima *in vitro*. Para ello las cubetas del espectrofotómetro eran incubadas con el medio de reacción a pH 8, 10 min en un baño a la temperatura a la que se iba a ensayar (30 °C, 40 °C, 50 °C). Se añadía el extracto crudo y tras agitar se incubaban un minuto más para minimizar efectos sobre la actividad al disminuir la temperatura del medio. Rápidamente se seguía la actividad enzimática durante el primer minuto.

## 2.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS

---

### 2.8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para la realización de esta determinación específica de la cantidad de PEPC, se usaron los extractos crudos congelados utilizados para la determinación de la actividad PEPC de los ensayos. Las tres repeticiones realizadas de cada condición se mezclaron a partes iguales para obtener el extracto para el gel.

Para la electroforesis en condiciones desnaturizantes se utilizaron geles discontinuos, constituidos por un gel de separación al 8% de acrilamida (p/v) y un gel de compactación al 4% de acrilamida (p/v). El gel de separación se preparó con la mezcla de acrilamida/bisacrilamida en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS al 0,1% (p/v), persulfato amónico al 0,5% (p/v) y TEMED 0,01% (v/v). El gel de compactación contenía los mismos componentes, excepto que el tampón utilizado fue Tris-HCl 125 mM pH 6,8 y el contenido de acrilamida era del 4%. Las muestras fueron suplementadas con tampón de disociación compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 6,8, glicerol 25% (v/v), SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,02% (p/v). Finalmente, las muestras se desnaturalizaron incubándolas 2 min a 90° y se resolvieron en el gel de acrilamida en una cubeta Mini-Protean® III-2D Cell (Bio-Rad) que contenía tampón de electroforesis Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH8,3 y SDS al 0,1% (p/v), a voltaje constante de 120 V durante 2 h. Los pesos moleculares de referencia se determinaron utilizando como marcadores proteínas preteñidas de pesos moleculares conocidos (gTP-bio RGB Prestained Protein Ladder) o PEPC purificada.

Los geles en algunos casos fueron teñidos y secados y en otros utilizados para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa y revelarlas con anticuerpos específicos anti PEPC. Los geles transferidos eran teñidos y secados para confirmar la adecuada transferencia de las proteínas.

### 2.8.2. Tinción con azul de Coomassie y secado de geles

Los geles se sumergieron durante 15 minutos, en agitación suave, en una solución fijadora compuesta de agua/metanol/ácido acético en relación 5:4:1. Posteriormente se hicieron 3 lavados con agua destilada de 10 min de duración cada uno. Finalmente el gel se tiñó con Azul de Coomassie Colloidal G-250. La composición de este tinte era Coomassie Blue G-250 al 0,12% (v/v), sulfato de amonio al 10% (p/v), ácido fosfórico al 10% (v/v) y metanol al 20% (v/v). Por último los geles se secaron al vacío durante 2 horas en un equipo de secado de la marca Bio-Rad (modelo 543) conectado a una bomba de vacío.

## 2.9. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

---

### 2.9.1. Tipos de anticuerpos utilizados en este trabajo

- Anticuerpos totales (PEPC C<sub>4</sub>-IgGs) dirigidos sobre la totalidad de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo. Producidos en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla.

### 2.9.2. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos (Western blot).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se sumergió durante 1 h en agitación en tampón TGM (Tris 48 mM-Glicina 39 mM pH 9,2, metanol al 20% (v/v) y SDS al 0,037% (p/v). La transferencia de los polipéptidos a la membrana de nitrocelulosa (Sigma, poro 0,2  $\mu$ m) se realizó utilizando el tampón TGM, en un aparato Semidry Transfer blot (Bio-Rad), con voltaje constante (10 V) durante 25 min y una corriente límite de 5,5 mA/cm<sup>2</sup>. Una vez finalizada la transferencia se realizó el siguiente tratamiento de la membrana a temperatura ambiente:

1. Saturación de la membrana. Esta se incubó 1 h con tampón TBS conteniendo leche desnatada en polvo al 5% (p/v). Con este tratamiento se saturaron los sitios de unión inespecíficos.
2. Incubación con anticuerpos primarios. La membrana se incubó durante 3 h en agitación continua con los anticuerpos primarios.
3. Utilizando el sistema de detección SNAP i.d. ® Protein Detection System (Millipore) y siguiendo las instrucciones del fabricante, tras lavar la membrana con tampón TBS compuesto por Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Nonidet (0,05% v/v), esta se incubó con anticuerpos secundarios anti-conejo (Bio-Rad), marcados con peroxidasa durante 15 min. Tras esto, se procedió a lavar la membrana de nuevo con tampón TBS-Nonidet (0,05 v/v). La membrana de nitrocelulosa se reveló mediante 4-cloronaftol.

## 2.10. PARÁMETROS AGRONÓMICOS

---

Estos parámetros fueron medidos y suministrados por AIMCRA en los ensayos de campo. En los ensayos en condiciones controladas fueron determinados en el laboratorio de Fisiología Vegetal.

### 2.10.1. Determinación del Brix

El brix indica la cantidad de materia con capacidad refractométrica que contiene el jugo de la remolacha (materia seca con capacidad para disolverse). La mayor proporción de solutos en la remolacha la constituye la sacarosa, por esto en algunos casos se suele utilizar como un indicador de la riqueza en azúcar. Con una prensa se extrae el jugo de la raíz fresca de remolacha. El jugo se coloca en un refractómetro graduado. El refractómetro se basa en la proporcionalidad existente entre el índice de refracción de una solución y su concentración (Gordo 2003). La medida obtenida se expresa en °Brix, y equivale a % de materia seca en disolución.

### 2.10.2. Materia seca

La materia seca de hojas y raíces se determina a partir de una cantidad conocida de material fresco (PF), suficientemente representativa (aprox. 100 g). Se somete a temperatura de aproximadamente 55 °C hasta peso constante (PS). Con estos dos parámetros se calcula el % de materia seca.

### 2.10.3. Polarización o sacarimetría

La sacarimetría es un método de medida de sacarosa utilizando la propiedad que poseen las soluciones de sacarosa de desviar el plano de luz polarizada. La desviación del plano es directamente proporcional a la concentración de la solución (Gordo 2003). En el jugo de remolacha, además de la sacarosa, existen otras sustancias con capacidad para desviar la luz polarizada (glucosa, fructosa, diversos aminoácidos y rafinosa) que hacen que las medidas obtenidas presenten cierto error respecto a la cantidad real de sacarosa. Para ajustar más las medidas los sacarímetros son polarímetros que están modificados en su escala y están calibrados a partir de sacarosa. El resultado se expresa en % de polarización y equivale a g de sacarosa/100 g de peso fresco de raíz. La composición de la raíz fue analizada según los métodos y procedimientos establecidos en el Reglamento Oficial de Recepción y Análisis (BOE, 13/10/1980; BOE, 09/06/1984).

### 2.10.4. Elementos melacígenos

Corresponden al Nitrógeno alfa-amino (N- $\alpha$ -amino), Azúcares reductores, Sodio y Potasio. Estos elementos acompañan al jugo de la remolacha. Su contenido en la raíz depende del clima,



suelo, abonado y variedad de remolacha utilizada entre otros factores (Gordo 2003). Son los elementos más importantes a efecto de calidad industrial, ya que dificultan la extracción del azúcar y son los responsables del nivel de alcalinidad de los jugos. Su determinación se llevó a cabo según el Reglamento Oficial de Recepción y Análisis (BOE, 13/10/1980, BOE 09/06/1984), utilizando un autoanalizador.

#### **2.10.5. LAI: Índice de Área Foliar**

Área total de la superficie superior de las hojas por área de unidad de terreno que se encuentre directamente debajo de la planta. A partir de 1 m lineal (5-6 plantas en la hilera del cultivo) se tomó una muestra representativa de limbos (4 hojas/planta). Se pesaron y se les midió el ancho (A) y el largo (L). A partir de estas medidas se obtiene la superficie foliar, con la fórmula:

$$LAI = 14.5 - 2.3 \times L - 1.3 \times A + 0.1 \times L^2 + 0.2 \times A^2 + 0.6 \times A \times L$$

Optimizada para la morfología de las hojas de remolacha.

De la submuestra se estima la muestra a partir del peso de todos los limbos y el LAI del cultivo a partir de la superficie arrancada (0,5 m<sup>2</sup>), por extrapolación.

#### **2.10.6. Producción de biomasa: raíz y hojas**

De las muestras periódicas se determinó por gravimetría la biomasa de raíz y hojas (peciolo+limbos), tanto en peso fresco como en peso seco. El paso de biomasa de la muestra a producción por hectárea se realizó utilizando el número de plantas establecida por m<sup>2</sup> en campo, previamente determinadas para cada repetición.

#### **2.10.7. Producción de sacarosa (Az/Ha)**

El cálculo de la producción de azúcar por hectárea se realiza tomando la producción de raíz y aplicando el porcentaje de sacarosa sobre peso fresco que representa la polarización previamente determinada.

#### **2.10.8. Superficie foliar específica (SFE)**

Las hojas medidas para el cálculo del área foliar eran pesadas de forma individual y se obtenía la superficie foliar específica/ peso fresco (SFE PF). Una vez obtenido el peso seco y calculado el % de materia seca, se refería la superficie foliar específica al peso seco (SFE PS).

## **2.11. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA**

---

En algunos ensayos en cámara de cultivo se determinó la tasa fotosintética y la conductancia estomática.

Estos datos se obtuvieron gracias a la colaboración de la Dra. Susana Redondo Gómez del área de Ecología del departamento. Se utilizaron equipos portátiles de medición del intercambio de gases en sistema abierto (LI -6400, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA).

## 2.12. ANÁLISIS DE LOS DATOS

---

Para los parámetros analizados se contaba con tres réplicas para cada caso con las que se hicieron las medias (excepto la prolina y los contenidos hídricos donde las medias se realizaron antes del análisis estadístico), se determinó el error estándar y se realizaron test de comparación de medias o varianzas.

El análisis de los datos se realizó usando el programa informático SPSS Statistics de IBM ® Versión 22.

El análisis de la comparación de tratamientos en el caso de los túneles se realizó mediante el análisis Anova de una vía. Para el reagrupamiento de los tratamientos se aplicó como test Post-hoc el test Tukey-b. Esto se realizó para cada una de las condiciones de ensayo y para cada parámetro de los que se disponía de tres repeticiones.

Para la comparación de las medias en el caso de dos condiciones (microtúneles) se realizaron las Pruebas t de Student (t-test) para variables independientes.

La base de datos se preparó en Excel. Se estableció el nivel de correlación lineal entre todas las variables estudiadas, por campaña, por tratamiento y a nivel global. El estudio de las correlaciones entre las variables estudiadas se realizó de forma automática mediante un programa (en lenguaje Python) creado por el Dr. Juan José Martínez expresamente para este estudio. Para la inclusión en los resultados, solo fueron tenidas en cuenta aquellas correlaciones con  $n > 4$  y Coeficiente de Correlación de Pearson  $|r| > 0,5$ .



### **3. RESULTADOS**



### 3.1. LOS EFECTOS DEL TÚNEL Y LOS PARÁMETROS AGRONÓMICOS

---

En campañas anteriores, en concreto en el 2003, se detectaron disminuciones en la riqueza y en la polarización del cultivo obteniéndose valores más bajos que en los últimos 5 años. Durante ese año, las temperaturas registradas en el mes de mayo fueron inusualmente altas, de 2 °C a 3 °C de media, en las T<sup>a</sup> máximas (en agronomía se le refiere como un golpe de calor) y unas temperaturas mínimas en la primera semana de mayo que duplicaba las alcanzadas en años anteriores.

Con el objetivo de dilucidar si este comportamiento de las temperaturas podría estar en la base del descenso de riqueza observado, se diseñaron ensayos para inducir estas condiciones en el cultivo a lo largo de tres campañas agronómicas en los años 2003-2004 (1<sup>a</sup> campaña), 2004-2005 (2<sup>a</sup> campaña), 2005-2006 (3<sup>a</sup> campaña). Existe muy poco conocimiento sobre el efecto de la temperatura sobre el cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Esto determinó que en la 1<sup>a</sup> campaña se comenzara con la puesta a punto de experimentos para aislar de forma específica los efectos de altas temperaturas sobre la producción y la calidad. Las condiciones fueron ajustadas en la 2<sup>a</sup> y la 3<sup>a</sup> campañas. El diseño experimental se concretó en la instalación de dos túneles en la primera campaña, y de un solo túnel en la segunda y la tercera en la que se propició un gradiente de temperatura. En este primer capítulo se muestra el efecto del túnel en los parámetros climáticos y agronómicos del cultivo en las tres campañas individualmente. Posteriormente se compararán de forma global las tres campañas estudiadas.

#### 3.1.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1<sup>a</sup> campaña)

---

En este capítulo se presentan los datos climáticos y agronómicos de este primer ensayo de golpe de calor realizados durante la campaña de 2004. Para lograr un aumento de la T<sup>a</sup> se colocaron dos túneles de plástico abiertos por ambos extremos sobre una parcela de 8 x 21 m cada uno, sostenidos por una estructura metálica. Uno de ellos (T3, ventilado) tenía aberturas laterales adicionales en los plásticos (Fig. 1.1). Los túneles se colocaron el día 14 de abril y se mantuvieron hasta la fecha de recolección, 26 de julio. Las plantas fueron regadas por goteo hasta el 8 de julio, fecha del último riego anterior al muestreo 7. El ensayo térmico presentaba estas condiciones (Fig. 1.1).

- Control: parcela de cultivo sin túnel (T1)
- Sin ventilación: parcela de cultivo con túnel completo ventilado por los extremos pero sin ventanas laterales (T2)
- Ventilado: túnel con ventanas laterales para crear situación intermedia (T3)

Los registros de  $T^a$  y humedad relativa fueron tomados por registradores en continuo (modelo HOBO U12-13; marca Onset) cada 30 minutos.



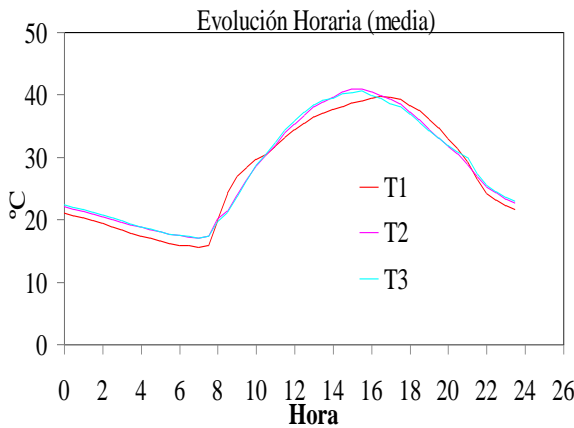
**Figura 1.1.** Diseño del ensayo térmico. Se muestra la colocación de las parcelas de ensayo y el código de colores utilizado así como las ventanas laterales del túnel ventilado.

#### ***3.1.1.1. Los túneles produjeron efectos limitados en la temperatura, la humedad y la luz.***

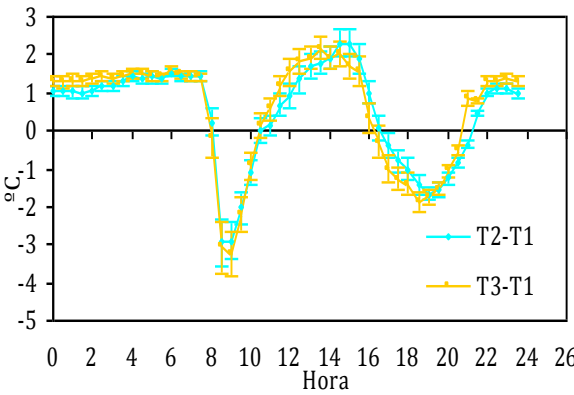
Se realizó un seguimiento de datos ambientales ( $T^a$ , humedad y radiación) que pudieran verse afectados por la colocación de los túneles, tanto completo como ventilado. Los resultados muestran que los túneles produjeron variaciones durante el día en los ciclos de temperatura. En la figura 1.2 se observa la evolución media de la temperatura por horas en todo el periodo en el que estuvieron colocados los túneles (13 de abril-26 de julio). En la figura 1.3 se muestran las diferencias medias de temperatura entre el control (T1) y cada uno de los tratamientos (T2-T1; T3-T1) a lo largo del periodo muestreado. Las tres condiciones presentan los mínimos de temperatura a las 7:30 h aproximadamente, siendo la temperatura mínima exterior inferior a la registrada en los túneles. A partir de esta hora, comienza un ascenso en los tres tratamientos hasta alcanzar la temperatura máxima. En los túneles esto ocurre a alrededor de las 15:30 h mientras que en el testigo es alrededor de las 17:00 h (Fig. 1.2). En cuanto a las diferencias de  $T^a$  entre el exterior y el interior se observan varios puntos de interés. A primera hora de la mañana, la zona de control se calentaba más rápidamente que el interior de los túneles dando una diferencia de  $T^a$  de hasta 4 grados menos en los túneles (Fig. 1.3). Por la tarde los túneles se enfriaban más rápidamente, alcanzando una diferencia de temperatura respecto del control de unos 2 °C (Fig. 1.3). Sin embargo

durante el periodo central del día, los túneles alcanzaron  $T^a$  mas altas con una media de entre 2 y 3 grados más que el control sin cubrir (Fig. 1.3).

También se registraron cambios en la  $T^a$  máxima y en la humedad relativa (Tabla 1.2). El túnel sin ventilación (T2) consiguió aumentar 1,5 °C la temperatura máxima respecto al control y el interior del túnel aireado mostró una temperatura máxima intermedia entre el control y el túnel completo (Tabla 1.1). La menor humedad relativa fue alcanzada en el túnel ventilado (Tabla1.2; T3, HR media). En cuanto a la cantidad de luz, se midió de forma puntual a diferentes horas del día y en momentos distintos en el interior y en el exterior del túnel. La cantidad de radiación PAR medida en el interior fue un 76% del total incidente.



**Figura 1.2.** La gráfica muestra la evolución de la temperatura media a lo largo del día en los tres tratamientos. T1, control; T2, túnel completo, T3, túnel ventilado.



**Figura 1.3.** La gráfica muestra las diferencias entre la temperatura de T2 y T1(---) y T3 y T1 (---)

**Tabla 1.1.** Temperatura media, mínima y máxima en las tres condiciones de tratamiento T1 (control), T2 (Túnel sin ventilación), T3 (Túnel ventilado). Datos de los meses de junio y julio. Fuente: Memoria 2006, AIMCRA

°C	$T^a$ Media	$T^a$ Mínima	$T^a$ Máxima
T1	27,53	15,32	40,59
T2	28,03	16,91	42,06
T3	28,30	17,01	41,70

**Tabla 1.2.** Humedad relativa media, mínima y máxima en las tres condiciones de tratamiento T1 (control), T2 (Túnel sin ventilación), T3 (Túnel ventilado). Datos de los meses de junio y julio. Fuente: Memoria 2006, AIMCRA

%	HR Media	HR Mínima	HR Máxima
T1	59,66	26,80	93,64
T2	59,81	27,02	93,80
T3	57,02	27,54	87,37



Todos estos resultados muestran que las condiciones ambientales en las parcelas cubiertas con túneles variaron, aunque moderadamente, respecto a la parcela control sin cubrir, destacando mayor temperatura diurna en el túnel cerrado y menor humedad en el túnel ventilado.

#### 3.1.1.2. *Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos*

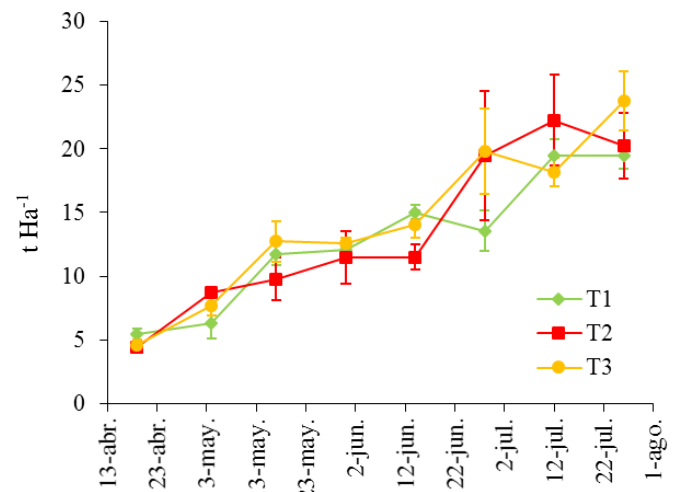
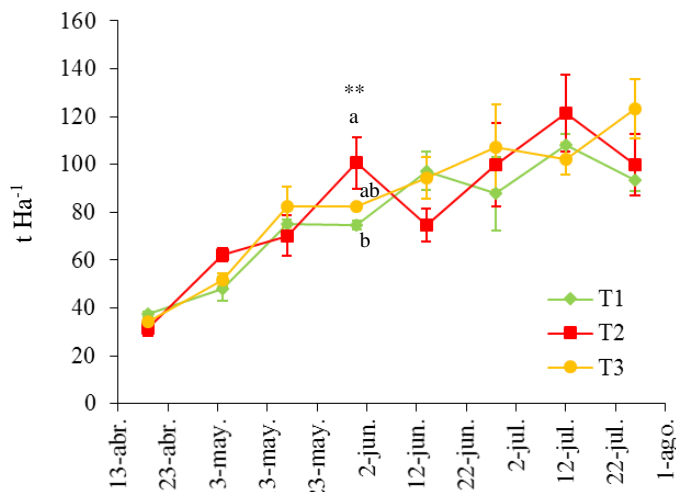
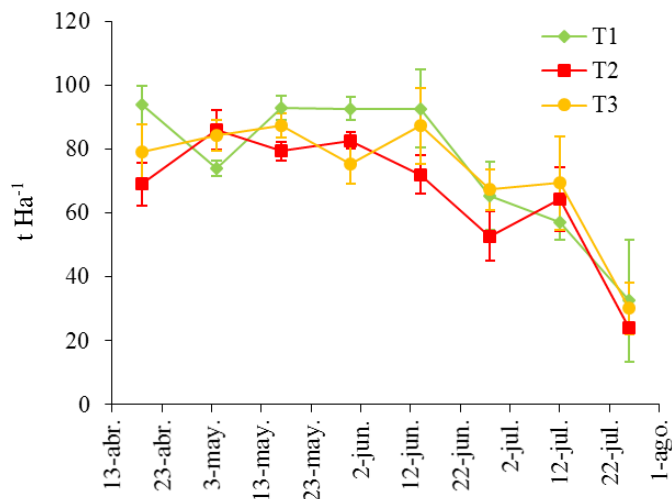
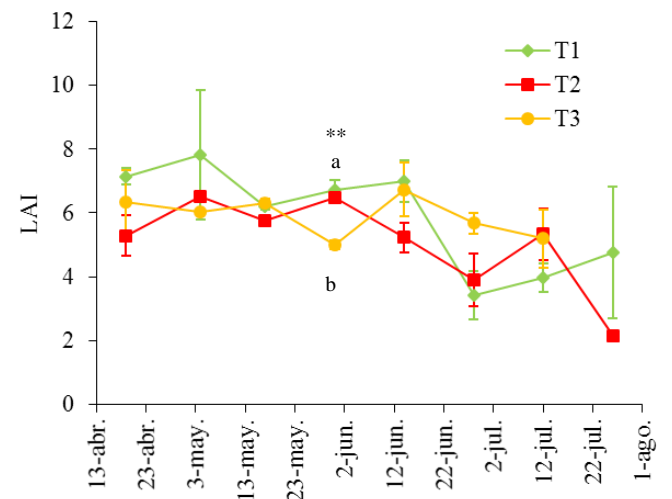
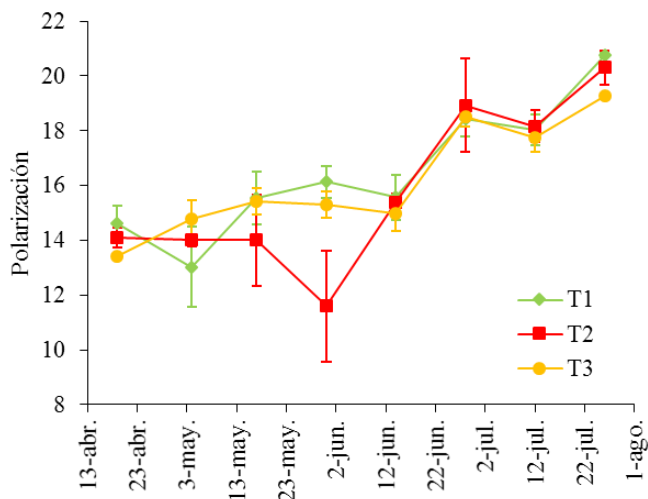
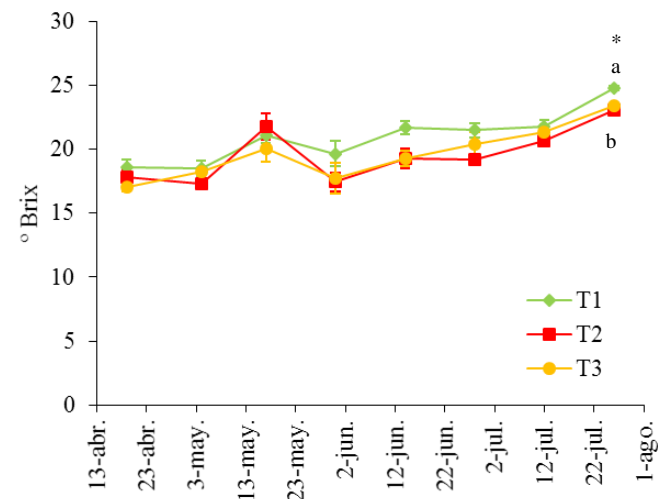
En este capítulo se presentan los datos agronómicos de la parcela control y las cubiertas por túneles. Se determinó el efecto que los túneles habían tenido en la producción de raíz, de sacarosa, de hojas, la polarización, el índice de área foliar y el brix tanto del peciolo (PBrix) como de raíces, todos ellos parámetros de interés agrícola. En cuanto a la **producción de raíz** (Fig. 1.4 A), sólo existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos en el 4º muestreo. Los tres tratamientos siguen la misma tendencia, alcanzando los valores máximos en el mes de julio. La **producción de sacarosa** (Fig. 1.4.B) sigue un perfil ascendente en los tres tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos. En la **producción de hojas** (Fig. 1.4 C), los tres tratamientos evolucionan de forma similar pero el túnel sin ventilación (T2) presenta valores más bajos de producción de hojas en 4 de los 7 muestreos, realizados durante el periodo de crecimiento. En los dos últimos muestreos, durante el mes de julio, cae la producción foliar y se iguala en los tres tratamientos. El **índice de área foliar** (LAI) (Fig. 1.4 D), indica la superficie de hojas por metro cuadrado de suelo. Este parámetro presentó unos máximos en torno a 6. En las condiciones control llegó a superar un valor de 9 en el segundo muestreo, punto con una amplia variabilidad. Los tratamientos muestran diferencia significativa entre ellos en el 4º muestreo. En el periodo final del cultivo, donde suele descender la cobertura foliar, los tres tratamientos se mantuvieron en valores entre 4 y 6.

La **polarización** es un método de medida de la concentración de sacarosa en una disolución utilizando la propiedad que poseen las soluciones de sacarosa de desviar el plano de luz polarizada. En la figura 1.4 E se muestra la evolución de este parámetro. Destaca la bajada que se produce en T2 a principios de junio, durante el 4º muestreo, aunque no es significativo debido a la gran variabilidad que presenta. Este parámetro se recupera posteriormente alcanzando valores de 19 a 20 en recolección, ligeramente menores en el túnel ventilado (T3).

A continuación se presentan parámetros agronómicos que indican el estado hídrico de la planta. Los valores de **Superficie Foliar Específica** (Fig. 1.4 G) indican la superficie foliar por kg de peso seco de hoja. La gráfica muestra una importante bajada de este parámetro en el control (T1) respecto a los túneles en junio y julio, con diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en el 6º muestreo, lo que sugiere menor contenido hídrico de las hojas de las remolachas controles respecto de aquella que han estado debajo de los túneles. La tabla que muestra los datos acumulados (Fig. 1.4 K) confirma esta diferencia en la SFE entre el control y las plantas bajo los túneles. Los parámetros de **% de materia seca de raíz** (Fig. 1.4 J) y **% de materia**

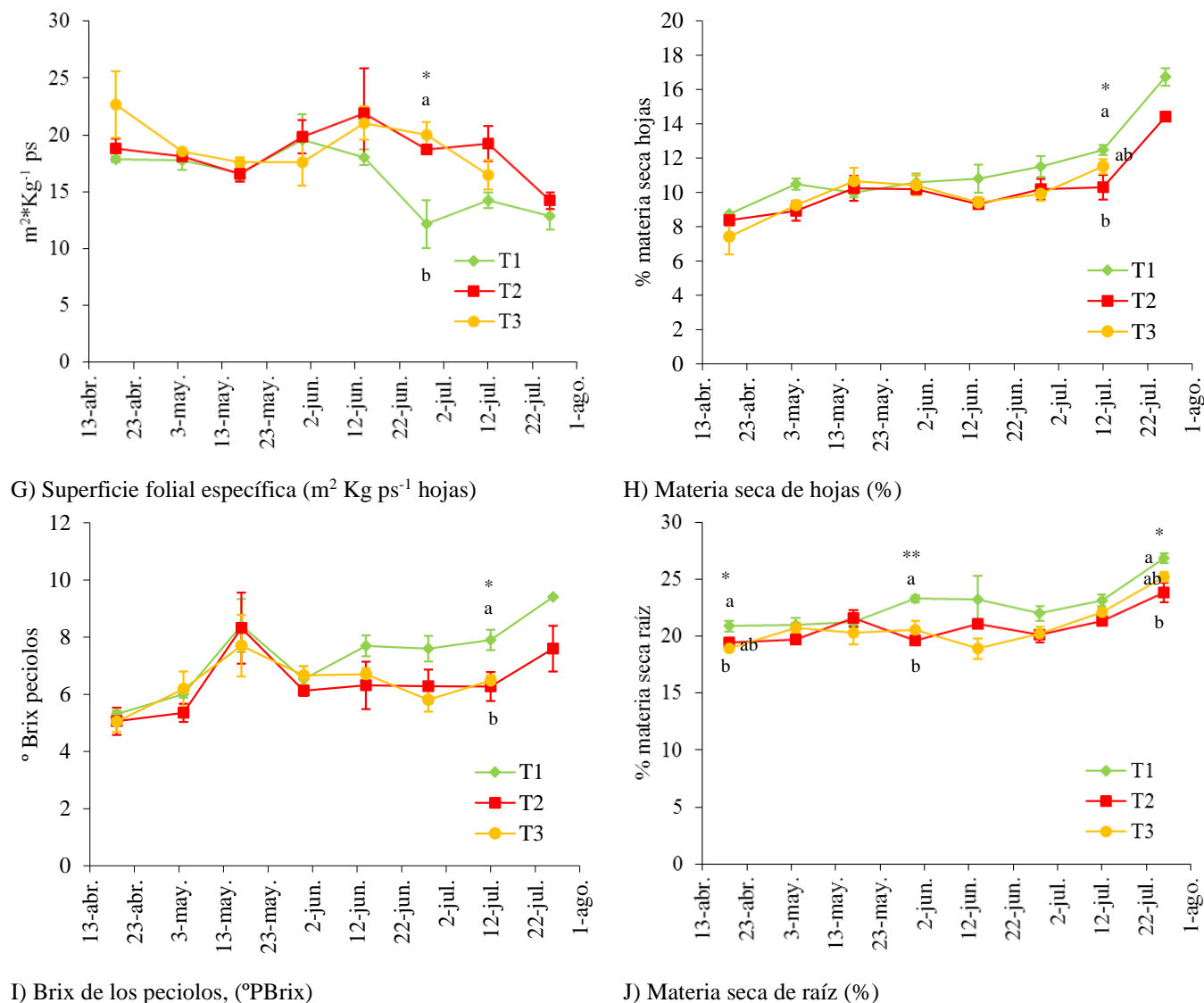
**seca de hojas** (Fig. 1.4. H), indican la proporción de materia seca que tienen los diferentes órganos analizados, también muestran valores más altos para las plantas control que para las plantas bajo los túneles. Estas diferencias son estadísticamente significativas en el muestreo 7° para la MSH y en el 1°, 4° y 8° para la MSR. En cuanto a la tendencia general en la 1ª campaña (Fig. 1.4 K, PORMSR, PORMSH) se confirma el mayor contenido en materia seca de los órganos de las plantas control. Estos datos indicarían que las plantas en los túneles están mejor preservadas desde el punto de vista hídrico y contienen menor materia seca que el control. En el caso del **Brix de la raíz**, esta diferencia entre las plantas control y las sometidas a tratamiento, se observa también a partir del 4° muestreo. Aunque con una menor amplitud, hay diferencia estadística entre T1 y los tratamientos bajo el túnel en el 8° muestreo. Los mayores valores del brix del control se evidencian en la tabla de valores acumulados (Fig. 1.4 K, BRIX). El brix es una medida de la materia seca con capacidad de disolverse que hay en el jugo de las diferentes partes de la planta. Es en la medida del **Brix del peciolo** (PBrix, Fig. 1.4 I) donde más evidente se hace esta diferencia. A partir del 5° muestreo, el control presenta mayores valores para este parámetro que las plantas del interior de los túneles, con diferencia significativa en el 7° muestreo y en los valores acumulados (Fig. 1.4 K, PBrix). En la raíz, es la sacarosa la molécula que mayor importancia tiene en los valores de este parámetro. Pero en el peciolo, podrían estar contribuyendo a este parámetro otras sustancias como osmolitos compatibles o azúcares reductores implicados en los movimientos de agua y glúcidos en el interior de la planta. En las posteriores campañas y en ensayos de laboratorio se ha constatado la relación entre el estado hídrico de la raíz y el brix de la raíz. En esta primera campaña, el efecto de protección de los túneles aumentó ligeramente el contenido hídrico de las plantas bajo plástico y es el parámetro del brix de peciolo el que mejor detecta esta diferencia en las condiciones del 2004 que se ve reflejada en una ligera dilución de la materia seca soluble.

En su conjunto estos resultados indican que la cobertura de los túneles está proporcionando protección frente a la pérdida de agua generando un ambiente de mayor humedad, que está en la base de los mayores contenidos hídricos de las plantas bajo plástico. Sin embargo, dado que en esta campaña no se han detectado grandes diferencias ambientales entre el control y las parcelas con túneles, esta mejora en el contenido hídrico de las remolachas bajo túnel ha tenido poca repercusión en parámetros como la producción de raíz, contenido de sacarosa y polarización de la raíz. Los túneles aumentaron la humedad relativa mínima (Tabla 1.2), creando un microclima que afectó a los parámetros relacionados con el contenido hídrico de la planta. Las plantas control mostraron un menor contenido hídrico en todos los órganos y las plantas bajo túnel una ligera dilución de la materia seca soluble (Brix de peciolo y de raíz, Fig. 1.4 F, I).

A) Producción de raíz (t Ha<sup>-1</sup>)B) Producción de sacarosa (t Ha<sup>-1</sup>)C) Producción de hojas (t Ha<sup>-1</sup>)D) LAI (m<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)E) Polarización (%: g sacarosa 100g<sup>-1</sup> ps)

F) Brix (°Brix)





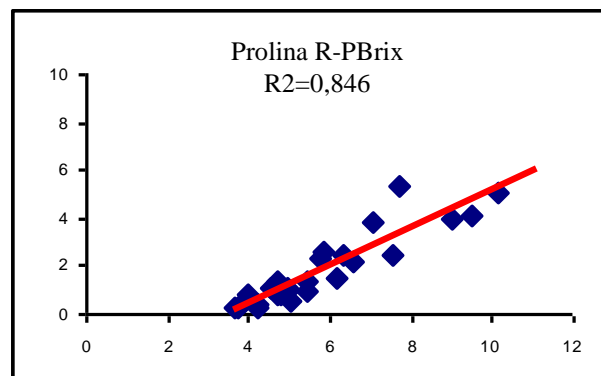
Trat	ProdR	ProdH	PBrix	POR MSR	POR MSH	BRIX	RPol	Az/Ha	SFE MS	LAI
T1	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a
T2	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a
T3	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a
sign			*	**	*	*			*	

K)

**Figura 1.4.** Evolución de los parámetros agronómicos a lo largo del ensayo. A) Producción de raíz; B) Producción de sacarosa; C) Producción de biomasa foliar; D) LAI, Índice de área foliar; E) Polarización (% de sacarosa); F) Brix ( $^{\circ}\text{Brix}$ ); G) Superficie foliar específica ( $\text{m}^2/\text{Kg ps}$  hojas); H) %MS hojas; I) PBrix,  $^{\circ}\text{Brix}$  de los peciolo; J) %MS de raíz. K) Análisis de tendencias en parámetros agronómicos reagrupados por campañas. (—◇—) Control; (—■—) T2; (—●—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I. Tukey-b. Letras diferentes implican grupos estadísticamente diferentes. (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001. Datos agronómicos obtenidos en colaboración de AIMCRA.

Para demostrar este último punto se determinó el contenido de prolina de la raíz. La prolina es un osmolito compatible que aumenta en condiciones de estrés o deficiencia hídrica. Dado que el **brix del jugo del peciolo (PBrix)** es el parámetro más afectado, mostrando una diferencia

significativa con los tratamientos de los túneles (Fig. 1.4.I), se estableció una correlación entre este parámetro y la prolina determinada en la raíz. Los resultados muestran una estrecha relación entre el PBrix y el contenido de prolina en la raíz con un coeficiente de correlación del  $r^2=0,846$  (Fig. 1.5). Por su facilidad para determinar este parámetro, incluso en el campo, estos resultados muestran que el PBrix podría tener gran relevancia como indicador del estrés hídrico de la planta o de niveles hídricos limitantes, de forma que a mayores valores de PBrix, mayores riesgos de déficit hídrico del cultivo.



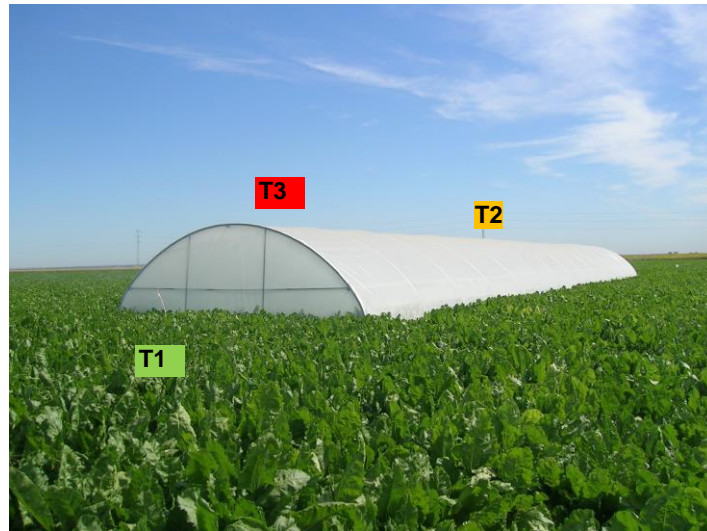
**Figura 1.5.** Correlación entre la concentración de prolina de la raíz y los °Brix (PBrix) del jugo de los peciols. Coeficiente de correlación,  $r^2=0,846$

### 3.1.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña)

---

En este capítulo se presentan los datos climáticos y agronómicos correspondientes a los ensayos con túneles para provocar aumento de temperatura y golpe de calor durante la campaña de 2005. Dado que la distribución de los túneles abiertos en la campaña anterior no había producido grandes variaciones en cuanto a los parámetros ambientales, sobre todo  $T^a$ , respecto del control, en esta campaña el diseño de los túneles fue ligeramente diferente. Para lograr un aumento de la  $T^a$ , durante esta campaña se colocó sobre una parcela de 8 x 42 m un solo túnel de plástico sostenido por una estructura metálica (Fig. 1.6). El túnel se colocó cerrado por uno de sus extremos el día 20 de marzo y se abrió el día 14 de abril. El túnel abierto permaneció sobre la parcela hasta la fecha de recolección, el 25 de julio (túnel abierto, Fig. 1.7).

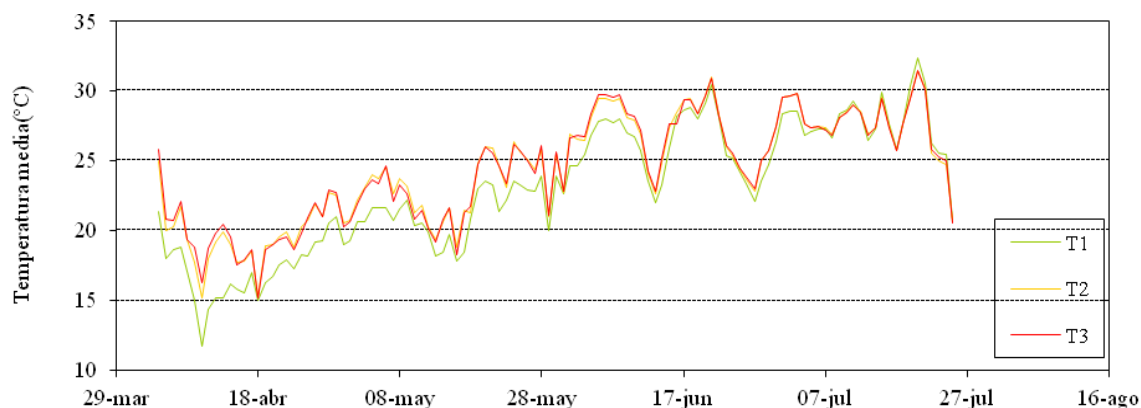
Los registros de  $T^a$  y humedad, así como los datos agronómicos fueron determinados por AIMCRA. Del análisis de estos datos en las distintas condiciones de ensayo se concluyó que el túnel instalado provocó el efecto deseado en cuanto al incremento de  $T^a$ . Se analizaron independientemente la zona de la mitad hasta el fondo cerrado del túnel, a la que se le llamó T3, y la zona de la mitad hasta el lado abierto del túnel a la que se le llamó T2. Esta estrategia se siguió en espera de obtener un gradiente de  $T^a$  entre las dos zonas. T1 representa una parcela colindante descubierta que se tomó como control (ver mas detalles en Materiales y Métodos). La figura 1.6 muestra una fotografía del túnel con el diseño de las diferentes zonas estudiadas. La evolución de la temperatura media exterior y la del interior del túnel para las dos zonas T2 y T3 se muestra en la figura 1.8. En ella se observa que las temperaturas en el control y tratamientos fueron aumentando desde los primeros muestreos hasta recolección. La figura 1.9 representa las variaciones de  $T^a$  máximas entre el exterior y el interior del túnel y muestra que el cierre del túnel produjo un incremento de  $T^a$  de entre 8 y 15 °C (golpe de calor) respecto del exterior. El pico máximo de variación (15 °C de diferencia) se registro el 14 de abril, fecha en que se decidió abrir el fondo del túnel. Estas diferencias de  $T^a$  (Fig. 1.9), se mantuvieron hasta mediados de junio a pesar de que el túnel se abrió a mediados de abril (14/04/06). También se observa que las diferencias de  $T^a$  respecto del exterior se fueron amortiguando hacia las fechas de recolección probablemente debido al fuerte incremento de las temperaturas exteriores (Fig. 1.9, a partir del 17 de junio).



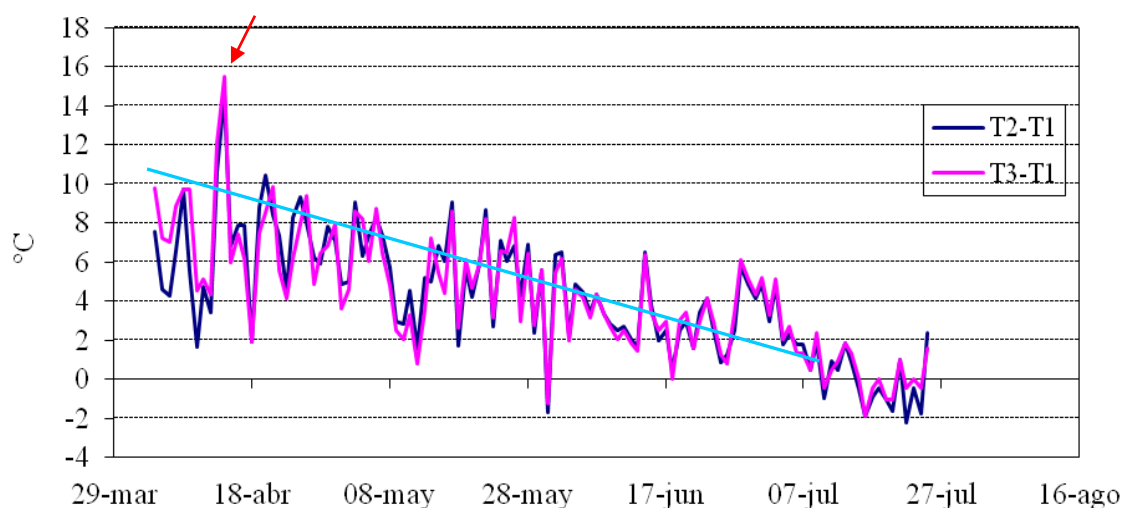
**Figura 1.6.** Diseño del ensayo térmico. Se muestra el túnel colocado en la parcela con las dos zonas estudiadas en la que T3 corresponde al fondo cerrado del túnel y T2 a la entrada abierta del túnel, y el código de colores asignado.



**Figura 1.7.** Aspecto de T3 el 16 de mayo, un mes después de eliminar los plásticos del extremo del túnel tapado, permitiendo la corriente de aire.



**Figura 1.8.** Evolución de las temperaturas medias a lo largo del ensayo. (---) T1; (---) T2; (---) T3



**Figura 1.9.** Diferencia entre las temperaturas máximas alcanzadas en el interior del túnel y el exterior. La flecha roja marca el momento de la apertura del túnel. (---)  $T^a$  máxima en T2- $T^a$  máxima en control; (---)  $T^a$  máxima en T3- $T^a$  máxima en control.

### 3.1.2.1. Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos

El golpe de calor tuvo una gran repercusión en los parámetros agronómicos. La figura 1.7 muestra el aspecto del T3 el día 16 de mayo, un mes después de producirse la máxima diferencia de  $T^a$  respecto del exterior. El análisis de los parámetros agronómicos mostró que la **producción por Ha** fue mucho menor en T3, tanto la **producción de raíz** (Fig. 1.10 A) como la de **sacarosa** (Fig. 1.10 B). En el control (T1) estos parámetros van aumentando en el transcurso del cultivo, y en T3 dejan de incrementarse tras el golpe de calor. Esto se manifiesta en diferencias significativas entre tratamientos del 4º al 7º muestreo para la producción de raíz y en el 4º y 6º muestreo para la

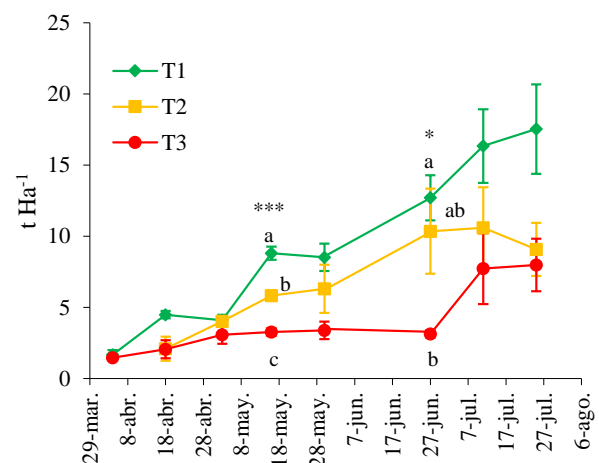
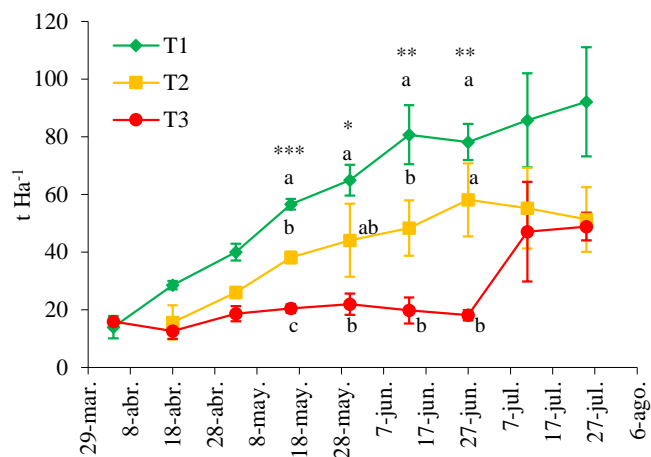
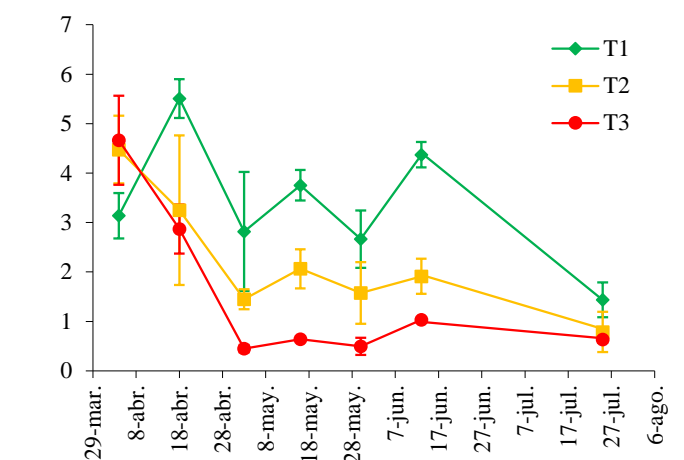
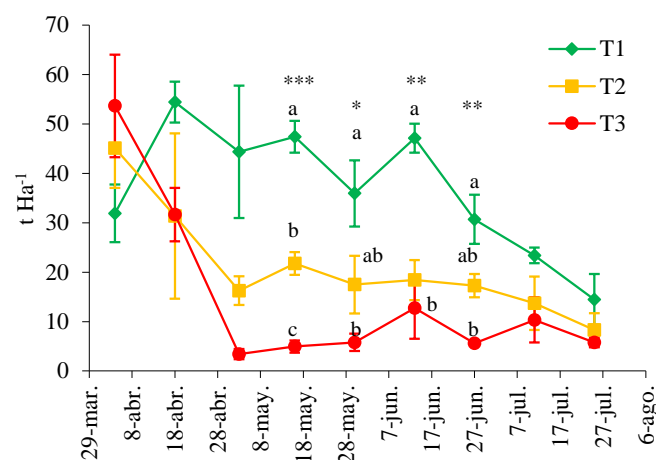


producción de sacarosa. Se observa una ligera recuperación al final, pero T3 no llega a los niveles de T1, ocupando T2 valores intermedios. El efecto de tratamiento en la producción de raíz y de sacarosa se pone de manifiesto en los datos agrupados (Fig. 1.10 K; ProdR, Az/Ha). Esta escasa producción de raíz por Ha se debió tanto a una detención en el crecimiento de las raíces, como a una mortalidad del 21% en T3 tras el golpe de calor.

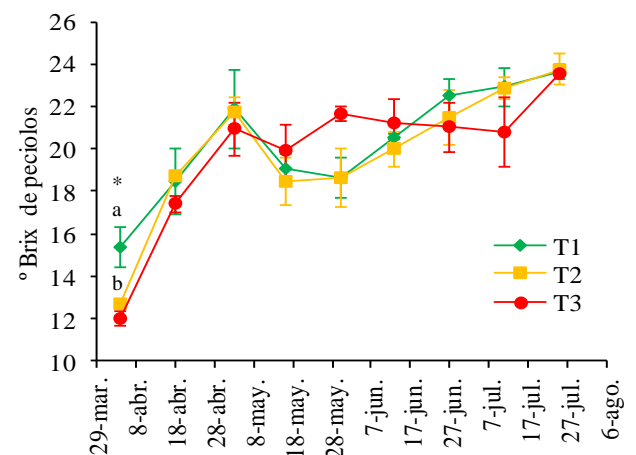
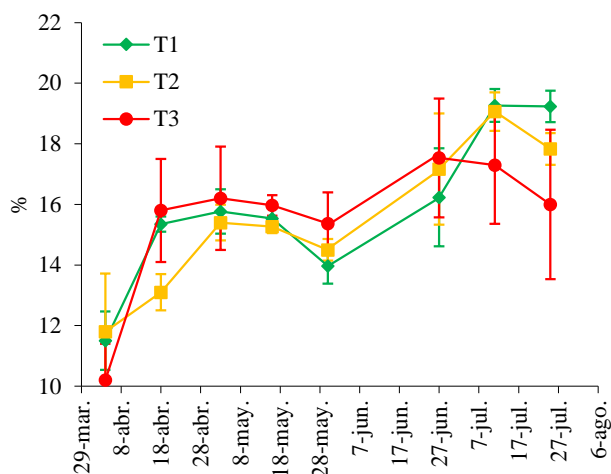
La producción de **biomasa foliar** puede explicar este estancamiento en el crecimiento de la parte heterótrofa. Tras el golpe de calor la biomasa de hojas desciende dramáticamente como puede verse en la figura 1.10 C. Esta disminución en T3 presenta diferencias significativas con la producción foliar del control en los mismos muestreos que la producción de raíz (del 4º al 7º) y en los datos acumulados (Fig. 1.10 K, Prod H). Desde el golpe de calor, las plantas van disminuyendo paulatinamente su producción y área foliar hasta llegar a los mínimos en el tercer muestreo (un mes después del golpe de calor, Fig. 1.10 A, B, C y D). Es admitida la existencia de una correlación positiva entre el vigor del follaje y el contenido en azúcar (Villarías 1996, 1999b), por tanto, los resultados presentados en este trabajo indican que la pérdida de producción foliar como consecuencia del golpe de calor pudo ser una de las principales causas que limitaron la producción en t/Ha de raíz y de azúcar produciendo importantes pérdidas en la cosecha.

La reducción del área foliar con capacidad de transpirar es una respuesta ampliamente extendida en las plantas a la situación de restricción hídrica. En la remolacha azucarera de siembra otoñal se aprecia este proceso al llegar el verano. La evolución de la producción foliar, cobertura, y número de hojas por planta, siguen distribuciones parabólicas, comenzando a descender a mediados de mayo, cuando se alcanzan los 2500-3000 grados día (GDÍA) y las temperaturas medias rondan 25 °C. A pesar de esto, la producción de raíz y la polarización continúan creciendo hasta mediados de julio (Echevarría and Morillo-Velarde 2005). Los grados-día son una variable utilizada en agronomía para evaluar el estado fenológico de un cultivo a partir de la temperatura a la que ha estado sometido. Son los grados acumulados a lo largo de un periodo determinado sobre una T<sup>a</sup> umbral (T<sup>a</sup> a la que no hay crecimiento). Esto indica que en la remolacha azucarera, la temperatura está relacionada con la pérdida de superficie foliar, pero este descenso, en el momento adecuado, no frena ni el crecimiento de la raíz ni la acumulación de sacarosa. También puede observarse el fenómeno de pérdida de área foliar en los cultivos de secano, en los que las plantas presentan un menor LAI, y una menor producción de raíz. El control de la figura 1.10 C y D muestra la evolución de estos parámetros en condiciones estándar de desarrollo del cultivo. Este conjunto de resultados muestran que cuando la respuesta de la pérdida de hojas frente a las altas T<sup>a</sup> del verano se produce de forma paulatina en los cultivos controles, la producción de raíz no se afecta de forma importante; sin embargo, tiene efectos muy dramáticos para la producción cuando el golpe de calor se produce en plena época de crecimiento, y sin previa aclimatación. Además, esta pérdida de superficie foliar limitó los procesos de enfriamiento por evapotranspiración, lo que provocó que las

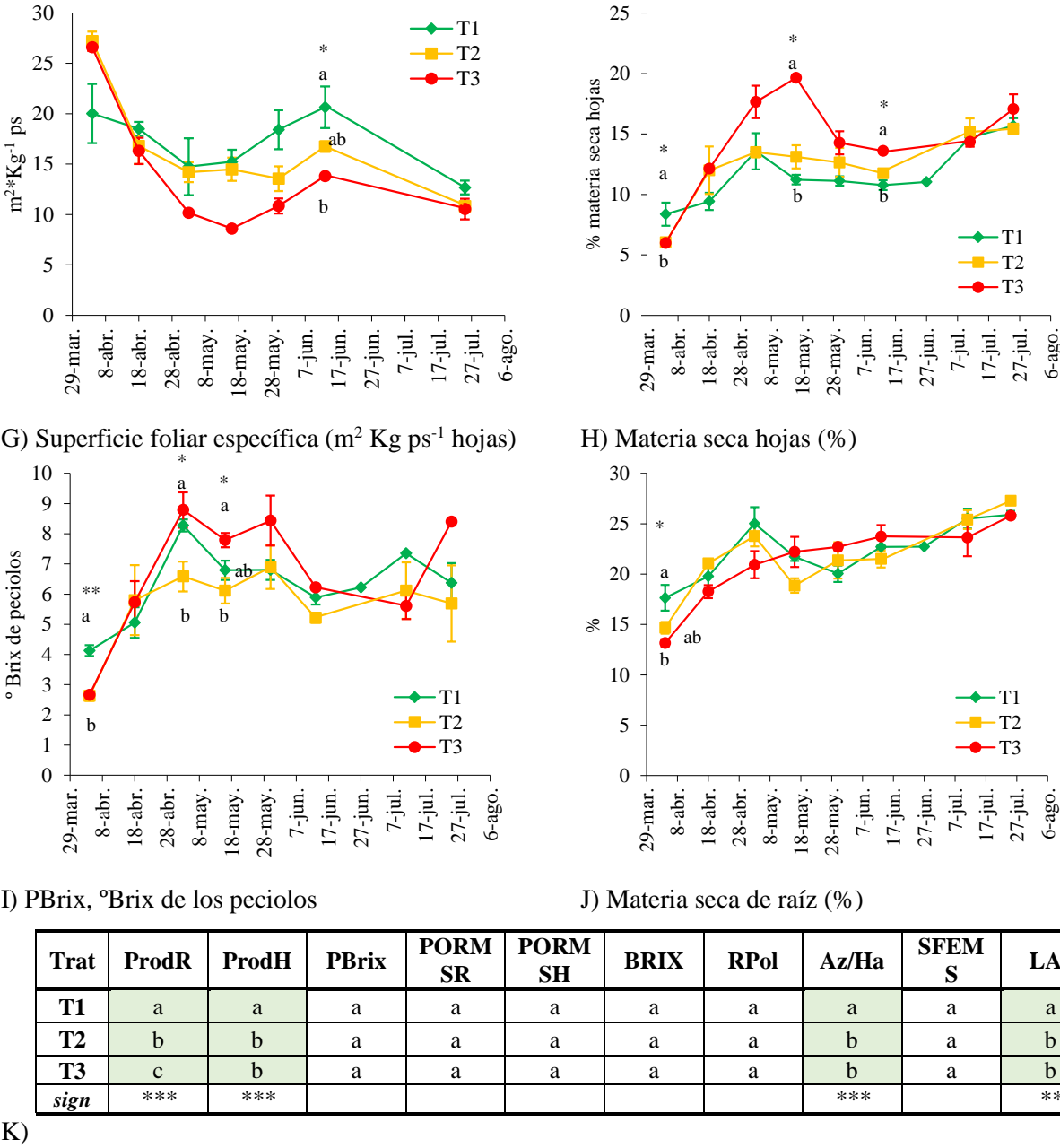
temperaturas continuaran altas en T3 y T2 respecto de T1 aún después de destapar el túnel. Por otro lado, el golpe de calor, tan llamativo a nivel de producción, (t/Ha) no afectó a la riqueza en sacarosa de las raíces (polarización: % de sacarosa por 100 gpf, Fig. 1.10 E) ni al brix (% de materia soluble en jugo por 100 gpf, Fig. 1.10 F). Las figuras 1.10 E y 1.10 F muestran que tanto el control (T1) como la parcela T3 mantienen valores similares a lo largo del ensayo independientemente del golpe de calor de T3. Estos resultados indican que las pérdidas en la producción de azúcar en t/Ha que se producen como consecuencia del golpe de calor (Fig. 1.10 B) son una consecuencia de la pérdida de biomasa de raíz, pero las remolachas que sobreviven al golpe de calor, aunque más pequeñas, acumulan la misma cantidad de azúcar por gpf que las remolachas de las parcelas controles. Para comprender mejor los procesos fisiológicos que podrían estar detrás de esta respuesta de la raíz se analizaron varios parámetros fisiológicos: contenido de glucosa, actividades hidrolíticas de la sacarosa, actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, cantidad de prolina y cantidad de adenilatos.

A) Producción de raíz (t Ha<sup>-1</sup>)B) Producción de sacarosa (t Ha<sup>-1</sup>)C) Producción de hojas (t Ha<sup>-1</sup>)

D) LAI

E) Polarización (%; g sacarosa 100 g ps<sup>-1</sup>)

F) Brix (°Brix)

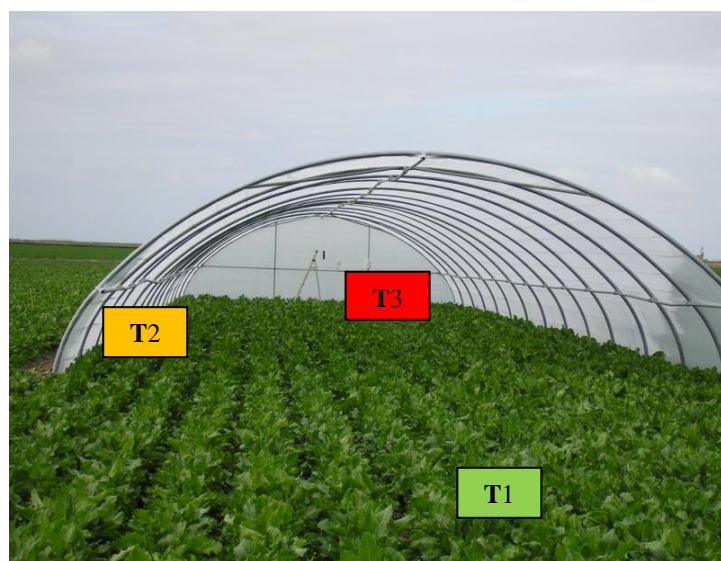


**Figura 1.10.** Evolución de los parámetros agronómicos a lo largo del ensayo. A) Producción de raíz; B) Producción de sacarosa; C) Producción de biomasa foliar; D) LAI, Índice de área foliar; E) Polarización (% de sacarosa); F) Brix (°Brix); G) Superficie foliar específica ( $m^2/Kg \cdot ps^{-1}$  hojas); H) % Materia seca peciolo; I) PBrix, °Brix de los peciolo; J) %MS de raíz; K) Análisis de tendencias en parámetros agronómicos reagrupados por campañas. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—●—) T3. Las barras de error muestran  $\pm EE$ . ANOVA I. Tukey-b. Letras diferentes implican grupos estadísticamente diferentes. (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001. Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto. Datos agronómicos obtenidos en colaboración de AIMCRA.

### 3.1.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña)

---

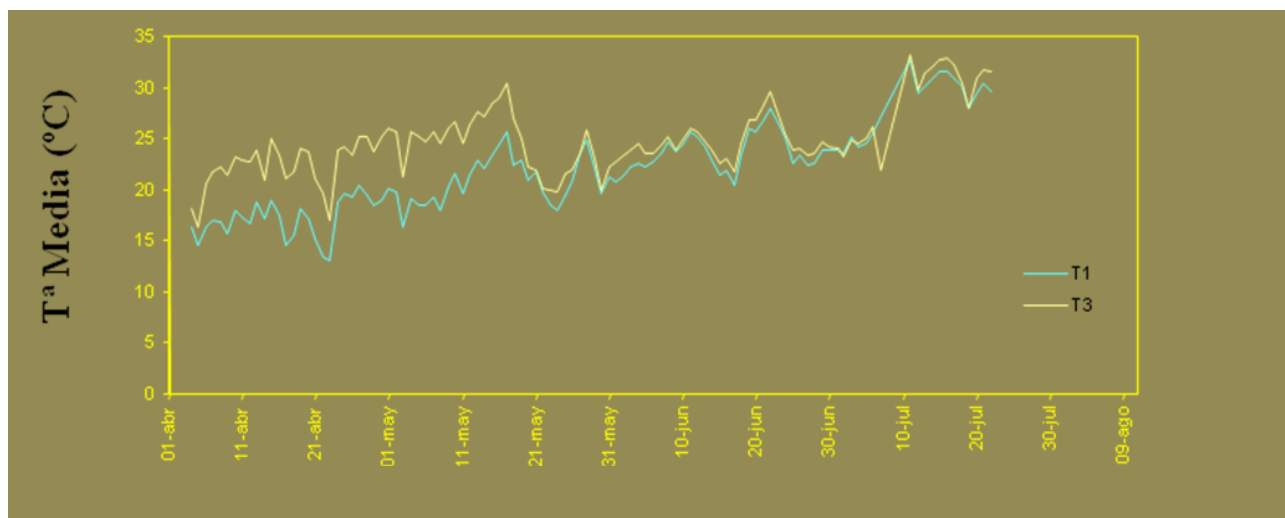
En este capítulo se presentan los datos climáticos y agronómicos de los ensayos del golpe de calor realizados durante la campaña de 2006. En esta campaña se reprodujeron las mismas condiciones de manejo y ensayo que en la campaña anterior, para reproducir el importante efecto del golpe de calor de abril del año anterior. Se instaló por tanto un túnel de plástico el 3 de abril del 2005 cuyas dimensiones fueron 8 m x 42 m (ancho x largo). Este túnel se cerró inicialmente por uno de sus extremos en la dirección de los vientos dominantes. La zona más cercana al extremo cerrado, que presentaría mayores temperaturas se denominó T3. La zona bajo el túnel desde la mitad hasta el extremo abierto, presentaría condiciones intermedias y se denominó T2. Las remolachas que servirían como control, T1, se tomaron de la zona cercana al túnel, fuera de su influencia. La figura 1.11 muestra el montaje del túnel con los sensores de temperatura y humedad instalados. Los registros de Tª y humedad, así como los datos agronómicos fueron determinados por AIMCRA.



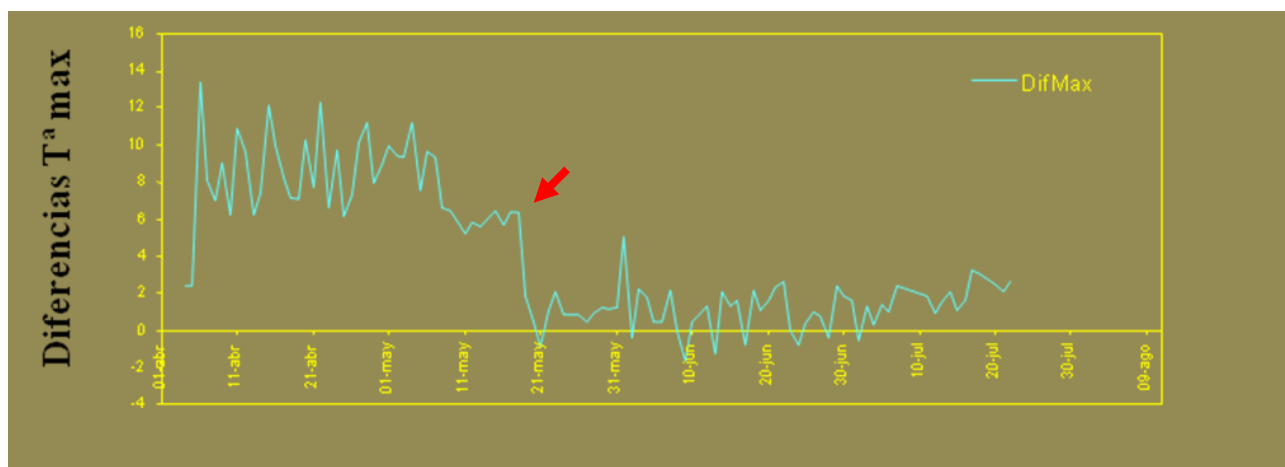
**Figura 1.11.** Túnel de la campaña 2005-2006 para el ensayo térmico. Las remolachas de la condición T2 fueron las cercanas al extremo abierto del túnel y las T3 las cercanas al extremo cerrado, como en la 2ª campaña.

La figura 1.12 muestra la evolución de las temperaturas medias en el interior del túnel en la zona T3 y en la parcela control (T1). De nuevo el túnel produjo un aumento importante de la temperatura. Este extremo cerrado fue abierto el día 19 de mayo del 2005 tras alcanzar en el interior del túnel 47 °C y diferencias en la temperatura máxima entre 8 °C y 15 °C respecto al exterior (Fig. 1.13). Tras la apertura del túnel, las temperaturas en el interior descendieron,

manteniéndose en torno a los valores del exterior, con una diferencia media entre las temperaturas máximas de 1,26 °C.



**Figura 1.12.** Evolución de las temperaturas medias a lo largo del ensayo. T1 (control), T3 (tratamiento más extremo dentro del túnel).



**Figura 1.13.** Diferencia entre las temperaturas máximas alcanzadas en el interior del túnel y el exterior. La flecha roja marca el momento de la apertura del túnel. (---) Tª máxima en T3-Tª máxima en control.

### 3.1.3.1. Efecto del túnel sobre los parámetros agronómicos

El túnel provocó un importante efecto sobre las plantas, como puede verse en la figura 1.14, donde se muestran las remolachas en la fecha en la que se abrió el extremo del túnel. En la figura 1.15 se muestra la comparación entre el aspecto de las plantas control y T3.



Remolachas T1

Remolachas T3

**Figura 1.14.** Aspecto de las remolachas del interior del túnel tras la apertura del túnel el 19 de mayo del 2006.

**Figura 1.15.** Detalle de las remolachas de la zona control (T1) y de la zona con mayor efecto del tratamiento (T3) tras la apertura del túnel. Puede observarse la diferencia en la morfología foliar y el color.

El análisis de los parámetros agronómicos mostró que la **producción de raíz por Ha** fue menor en T3 que en el control a lo largo del ensayo, haciéndose menores las diferencias en recolección (Fig. 1.16 A). Estas diferencias son significativas para los ensayos 3º y 4º. La tendencia se pone de manifiesto en los datos acumulados (Fig. 1.16 K; Prod R). En recolección, las remolachas control alcanzan 150 t/Ha y las de T3 alcanzan 100 t/Ha de media. En el 2005, el control alcanza máximos de 90 t/Ha y T3 llega solamente a 40 t/Ha de producción de raíz (Fig.1.10 A). Esto indica que a las condiciones impuestas por los túneles hay que añadirles las condiciones climáticas propias de cada campaña ya que en esta campaña se produjeron diferencias en las temperaturas entre el control y los tratamientos similares a los de la campaña anterior, sin embargo, los resultados agronómicos de producción de raíz y de sacarosa, aunque menores en el tratamiento T3 fueron muy superiores a los de la campaña anterior. Comparando los valores de **producción de hojas** (Fig. 1.16 C) se puede observar que el golpe de calor no produjo un estrés tan intenso durante esta 3ª campaña. Durante el 2006 la producción foliar vuelve a caer tras retirar el túnel (Fig. 1.16 C, 4º muestreo), aunque no de una forma tan drástica como la que se produjo en la campaña anterior, no presentándose diferencias significativas entre tratamientos por muestreo ni con los datos acumulados. T3 se mantiene en esta tercera campaña, con máximos de producción foliar de 80 t/Ha, valores que son incluso más altos que los valores obtenidos para la parcela control (55 t/Ha alcanzados por el control, T1) durante la campaña del 2005 (Fig.1.10 C). La evolución del **LAI** muestra una bajada importante de este parámetro en T3 respecto a T1 a lo largo de todos los muestreos (Fig. 1.16 D), con T2 en valores intermedios hasta el último muestreo donde se igualan

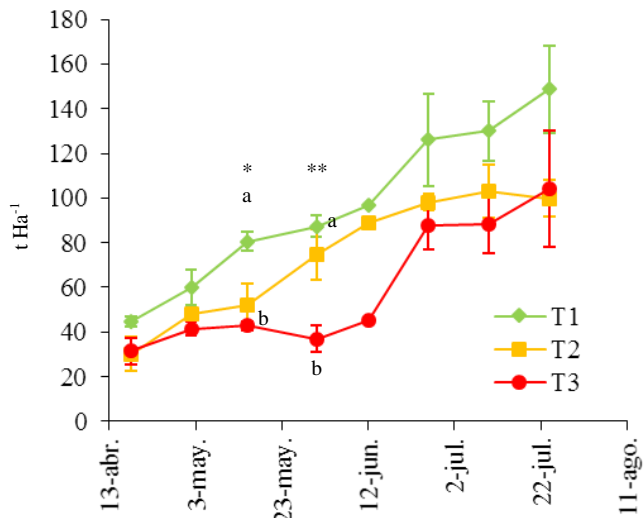
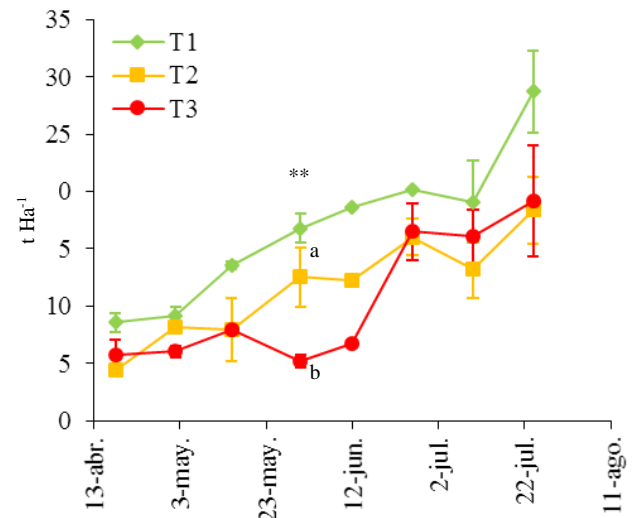
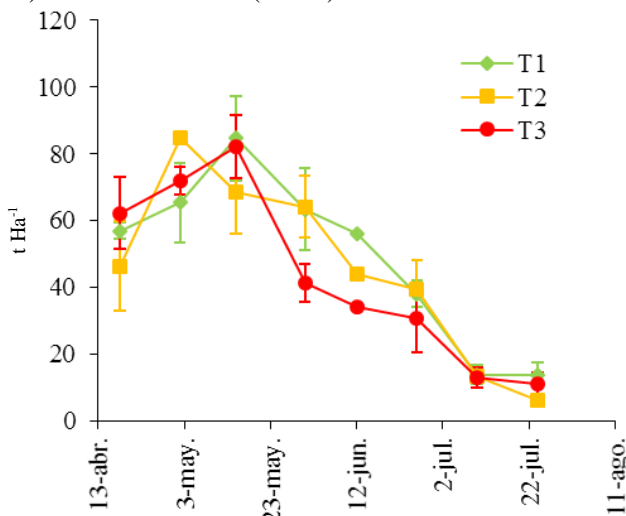
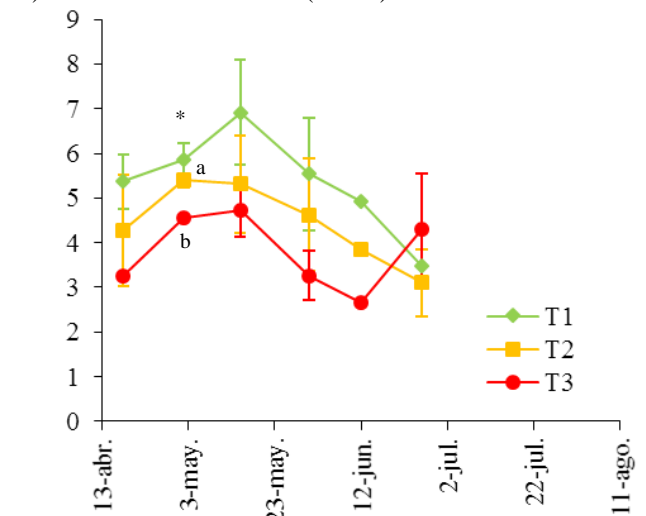
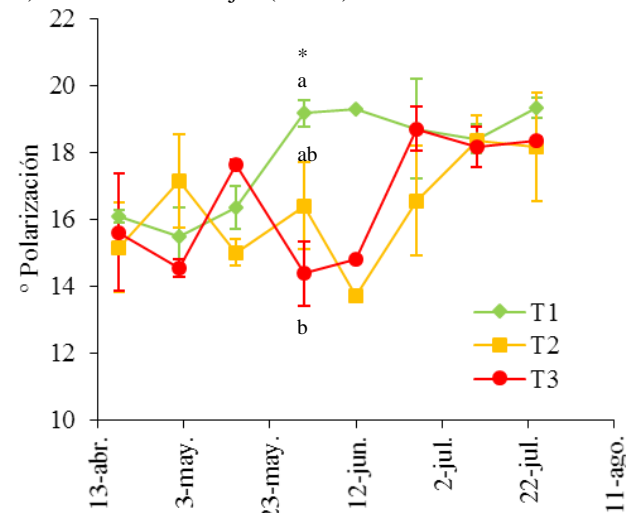
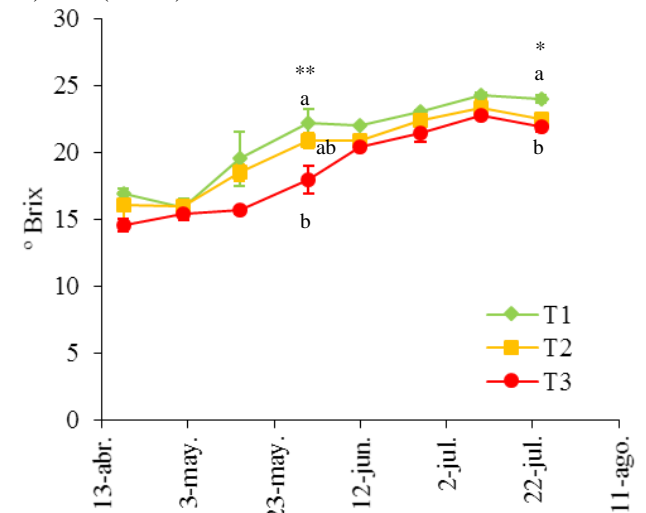


los tres tratamientos. Esta tendencia se pone de manifiesto cuando se acumulan los datos de cada tratamiento, presentando el control T1, diferencias significativas con los tratamientos, T2 y T3 (Fig. 1.16 K; LAI). Esta escasa diferencia en la producción en peso fresco de hojas y un LAI marcadamente diferente, puede explicarse desde el contenido en agua de las hojas y desde una morfología de la parte fotosintética diferente (Fig. 1.15, Remolachas T3). Efectivamente, al comparar las producciones foliares en peso seco (Fig. 1.16 B), T3 muestra valores menores que T1 desde el 3º muestreo (muestreo anterior a la apertura del túnel) hasta el penúltimo muestreo. En el último muestreo se iguala este parámetro para los tres tratamientos alcanzando los valores más bajos de la campaña. El peso fresco de hojas es similar en los tres tratamientos, pero la superficie fotosintética es menor en T3 (Fig. 1.15) por lo que las hojas de este tratamiento tienen mayor contenido en agua. En concreto, mayores peciolo que si cuentan para la producción de hojas. Esta disminución del área fotosintéticamente activa, podría explicar la reducción de la producción de raíz.

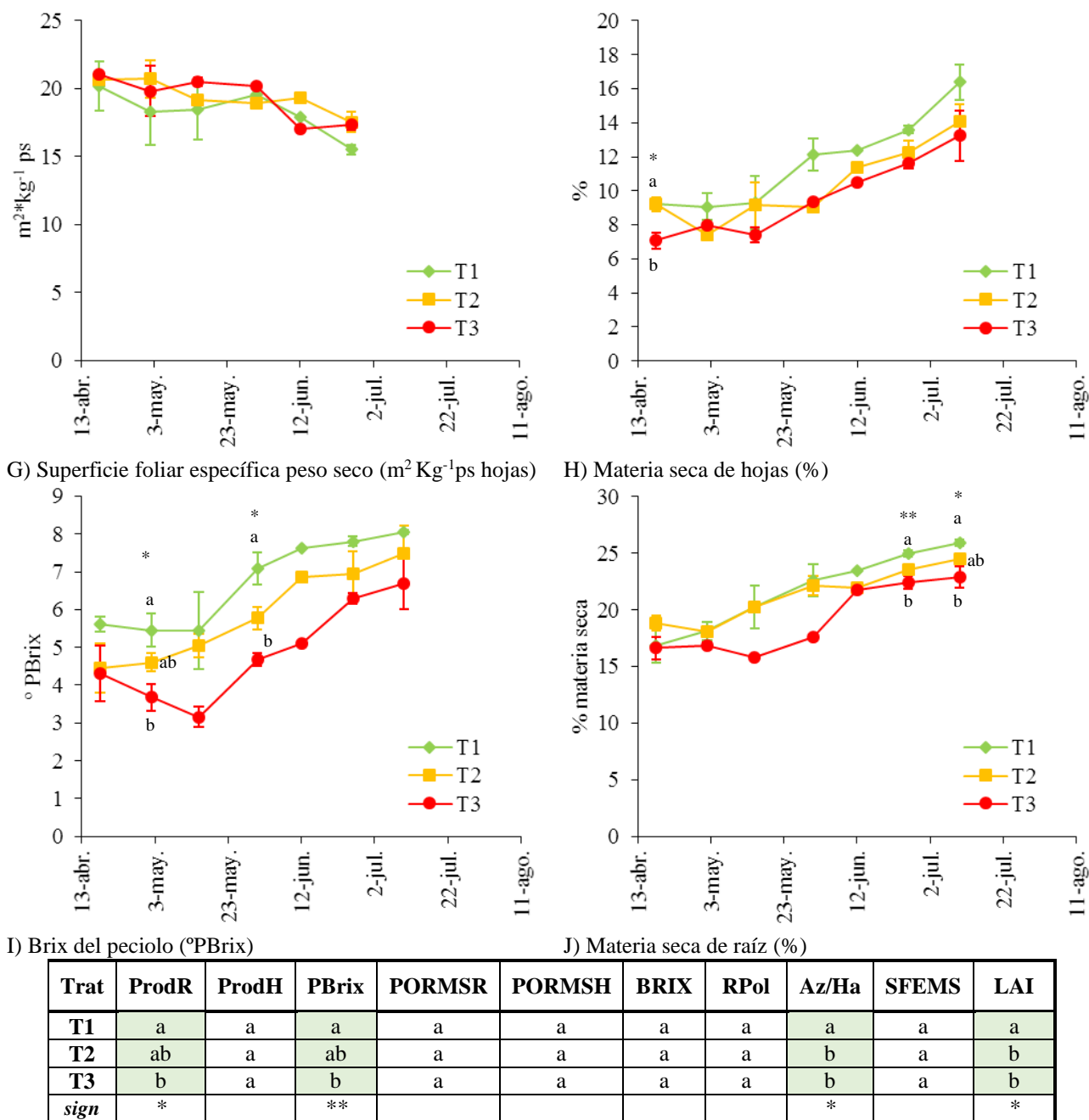
Los valores de la **polarización** en los tres tratamientos se encuentran en el rango de lo observado en la campaña anterior para las mismas fechas (Fig.1.16 E). Este parámetro muestra diferencias importantes entre T1 y T3 (5% más bajo que T1) para el 4º (con significación estadística) y 5º muestreo (31 de mayo, 12 de junio). En la campaña anterior este parámetro no mostró diferencias entre los tratamientos. La subida de polarización es general a partir de unos determinados grados día. En esta 3ª campaña se observa un retraso en ese aumento de la polarización en los tratamientos T2 y T3, al igual que en el tratamiento más estresado de la 1ª campaña, T2. Los golpes de calor podrían retrasar el aumento de la polarización, alterando la relación entre polarización y GDÍA. Respecto a esto, la tabla 1.3 muestra la correlación entre la polarización con los GDÍA en las tres campañas estudiadas. En las dos primeras campañas, la correlación entre estos dos parámetros es muy alta y muy significativa, sin embargo, en la última campaña no existe correlación con  $|r| > 0,5$  entre los grados día y la polarización de la raíz, por lo que no fue incorporada en el estudio de correlación.

El **Brix del peciolo** (Fig. 1.16 F) muestra un mayor contenido en solutos en el jugo de los peciolo del control que de T3 (diferencias significativas en el muestreo 2º y 4º, también en los valores acumulados, Fig. 1.16 K, PBrix), reforzando de nuevo la existencia de mayor contenido en agua de las plantas T3. El brix del peciolo mostró en anteriores campañas una buena correlación con el nivel de estrés hídrico. Un aumento del brix está relacionado con el aumento de solutos osmóticamente activos para contrarrestar bajos potenciales hídricos en el suelo. Por lo tanto las plantas de T3 presentaban menor estrés hídrico que las plantas control.



A) Producción de raíz (t Ha<sup>-1</sup>)B) Producción de sacarosa (t Ha<sup>-1</sup>)C) Producción de hojas (t Ha<sup>-1</sup>)D) LAI (m<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)E) Polarización (%; g sacarosa g ps<sup>-1</sup>)

F) Brix de la raíz (°Brix)



K)

**Figura 1.16.** Evolución de los parámetros agronómicos a lo largo del ensayo. A) Producción de raíz; B) Producción de sacarosa; C) Producción de biomasa foliar; D) LAI, Índice de área foliar; E) Polarización (% de sacarosa); F) Brix (°Brix); G) Superficie foliar específica (m<sup>2</sup>/Kg ps hojas); H) %MS peciolos; I) PBrix, °Brix de los peciolos; J) %MS de raíz; K) Análisis de tendencias en parámetros agronómicos reagrupados por campañas. (—◆—) Control; (—■—) T2; (—●—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I. Tukey-b. Letras diferentes implican grupos estadísticamente diferentes. (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001. Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto. Datos agronómicos obtenidos en colaboración de AIMCRA.

**Tabla 1.3.** Correlaciones entre polarización y grados día durante las tres campañas estudiadas. CP: coeficiente de Pearson, N: número de datos; (\*\*\*) sign <0,001. GDÍA, grados-día.

Correlación GDÍA-Polarización		
	CP	N
1ª Campaña (2003-2004)	0,859***	21
2ª Campaña (2004-2005)	0,789***	24
3ª Campaña (2005-2006)	-----	

### 3.1.4. Comparación de los parámetros agronómicos entre las tres campañas

---

El diseño experimental en la 1ª campaña demostró ser demasiado conservador y provocó una diferencia de tan solo 1,5 °C respecto al exterior. Aun así, se observó una bajada significativa de polarización en el tratamiento T2 (sin ventilación, el que mayor temperatura alcanzó) y un aumento del contenido hídrico de las plantas que se estaban desarrollando bajo los túneles. Esta campaña agrícola contó además con buenas lluvias y un adecuado perfil hídrico del terreno. Las observaciones de esta 1ª campaña llevaron a modificar el diseño para la campaña siguiente, en la que se optó por cerrar el túnel para aumentar la diferencia de temperatura.

En la 2ª campaña se consiguió crear el efecto del estrés térmico en el periodo de crecimiento y acumulación de sacarosa del cultivo, con unas diferencias de temperatura de 15 °C respecto al exterior. En la mayoría de parámetros agronómicos se evidencia el efecto conseguido y permite extraer conclusiones sobre las altas temperaturas en ese determinado momento fenológico. Esta campaña del 2005, mostró en general escasos valores de producción. Las lluvias fueron mucho más escasas ese año, con lo que el perfil hídrico no era tan favorable como el año anterior. Las plantas estaban sufriendo estrés hídrico cuando se les aplicó el choque térmico a pesar de recibir agua por goteo. La suma de los dos efectos amplificó las repercusiones del golpe de calor. Esto se corrobora con los datos de la 3ª campaña donde se repitió el diseño experimental de la 2ª campaña.

Los parámetros agronómicos evidencian que en esta 3ª campaña, la instalación del túnel también tuvo efecto sobre las plantas, pero las diferencias con el control no fueron tan evidentes como en la 2ª. En concreto, no se produjo la defoliación masiva y el control alcanzó altos niveles de producción en recolección. El año hidrológico durante ésta 3ª campaña fue similar al de la 1ª campaña. Esto refuerza la idea de que la amplitud de la respuesta de las plantas a altas temperaturas está relacionada con el perfil hídrico del suelo.

La comparación entre la 2ª y 3ª campaña nos ha permitido demostrar que con una buena disponibilidad hídrica en el perfil del suelo, los golpes de calor tienen mucho menos efecto en los parámetros agronómicos de la remolacha.

#### 3.1.4.1. Comparación de los datos climáticos del ensayo térmico a lo largo de las tres campañas.

En las gráficas de las páginas 101 hasta 108 (Fig.1.17 hasta Fig.1.23) se muestra la evolución de los datos climáticos durante las tres campañas muestreadas. Los datos del control se recogieron de las estaciones cercanas de la Junta de Andalucía, los datos de humedad y temperatura del interior de los túneles fueron medidos en continuo. Los datos de las variables derivadas como la

evapotranspiración (ET<sub>o</sub>) se han calculado a partir de las mediciones y de los datos de la Red de Estaciones Climáticas de Andalucía (ver Material y Método).

La evolución de la **temperatura máxima** alcanzada (Fig. 1.17) muestra claramente que los mayores choques térmicos producidos por la instalación de túneles fueron en la 2ª y la 3ª campaña. Además, durante la 1ª campaña, los valores de temperaturas máximas en las condiciones control se mantuvieron por debajo de 30 °C desde la instalación del túnel hasta el final de mayo. Es en junio cuando las Tª máximas empiezan a superar los 30 °C. En las otras dos campañas desde abril en el 2005 y desde finales de marzo en el 2006, se superan los 30 °C de máxima. La primera campaña muestra las temperaturas más suaves en estos momentos clave para el crecimiento de la raíz acumuladora.

La **temperatura media** (Fig. 1.18) no muestra diferencias importantes entre los tratamientos durante la 1ª campaña. En la campaña del 2005 (2ª campaña), se dan también las mismas diferencias entre el control y los tratamientos que las encontradas entre Tª máximas, pero esas diferencias son mas atenuadas. Donde sí hay una clara diferencia entre los tratamientos en este parámetro es en la tercera campaña.

La gráfica de la figura 1.19 muestra la **radiación solar** recibida por las plantas de cada condición. Puede observarse que el túnel disminuye sensiblemente la radiación solar. Mediciones previas indican que este efecto es sobre todo al atardecer y al amanecer. Es importante destacar que esta disminución se produjo en igual medida en las tres campañas. Siendo así, estos resultados permiten señalar que esta disminución en la radiación solar provocada por los túneles no está en la base de las diferencias en los parámetros de producción de las tres campañas, sobre todo en la 1ª campaña donde los datos agronómicos son muy similares entre el control y los tratamientos.

La **humedad relativa mínima** (Fig. 1.20) muestra los valores mayores durante la 1ª campaña, aunque no hay diferencias entre los tratamientos. Durante la tercera campaña se aprecia claramente el efecto del túnel (T3) que preserva los valores de humedad. En la segunda campaña no se observó el efecto protector del túnel y los valores más altos de humedad fueron muy bajos en los tres tratamientos y a lo largo de toda la cosecha. Estos registros ponen en evidencia el perfil hídrico bajo que se produjo en la segunda campaña que afectó tanto al control como a los tratamientos.

Se calculó la **evapotranspiración potencial** para las tres condiciones (Fig. 1.21 A). Se observa cómo en las tres campañas, el túnel disminuye la ET<sub>o</sub>, respecto al control. Este efecto es leve en el 2004, evidente en el 2005 y es en el 2006 cuando más diferencias muestran la condición

control y el túnel. Esto se evidencia aún más al representar la EToC en cada condición respecto a los grados día (Fig. 1.21 B). En la primera campaña el túnel genera diferencias entre el control y las dos condiciones bajo plástico representado respecto a los grados día, con diferencias de casi 2 puntos. En la segunda campaña puede observarse que el tratamiento con túneles sí generó diferencia entre el control, T2 y T3, siendo la condición más extrema, T3 (menor circulación de aire, mayor temperatura), la que mayores diferencias presenta respecto al control (T1). Durante la tercera campaña no hubo registrador de temperatura y humedad (HOBO) en la zona T2, por eso no se presentan los datos. Es en esta última campaña, donde mayores son las diferencias entre el control y el tratamiento, llegando a 5 puntos de diferencia. Los datos indican una fuerte influencia de los túneles en los parámetros de evapotranspiración.

La gráfica 1.22 muestra **la integral térmica (GDÍA)** de las plantas. Esta variable climática influye decisivamente en el momento fenológico de la planta. Se ha determinado que el desarrollo y el crecimiento de la remolacha azucarera es dependiente de la integral térmica, incluso se ha utilizado como base para la modelización (Qi et al. 2005). De las tres campañas estudiadas es en el 2006 donde más diferencia se observa entre las plantas control y las plantas bajo el túnel en cuanto a la integral térmica. Además puede observarse que en cada campaña, tanto el último muestreo como el momento del golpe de calor, coinciden con distintos valores de grado día y por tanto de desarrollo (ver también Tabla 1.4).

**Tabla 1.4:** Integral térmica en las tres campañas estudiadas en diferentes momentos del cultivo y el la condición control y bajo el túnel. GDÍA, Grados día.

	1ª Campaña (GDÍA)	2ª Campaña (GDÍA)	3ª Campaña (GDÍA)
Colocación del túnel y golpe de calor	1136	976	907
Recolección control	2685	3157	3168
Recolección túnel	2685	3273	3406
Alcanza 2500 GD Control	19/7/2004	28/6/2005	02/7/2006
Alcanza 2500 GD Túnel	19/7/2004	27/6/2005	19/6/2006

Según los datos recogidos en la tabla 1.4, son las plantas de la tercera campaña las que reciben en un momento más temprano el golpe de calor generado por el túnel con 907 GD cuando se producen los máximos de temperatura. También son las que acumulan mayor cantidad de grados días en el momento de la recolección tanto las plantas control como las que recibieron el tratamiento térmico (3168 y 3406 respectivamente). También puede observarse que durante la 1ª y la 2ª campaña, las plantas del control y el tratamiento alcanzan los 2500 GDÍA prácticamente en la misma fecha. Pero para la tercera campaña hay un desfase de 13 días entre el control y las plantas bajo el túnel. En la tercera campaña es cuando más efecto tuvo el túnel sobre la integral térmica y previsiblemente sobre el desarrollo de las plantas.

En la figura 1.23 se muestra las precipitaciones recibidas por el cultivo durante las campañas. Las plantas del interior del túnel y del exterior recibieron idéntica cantidad de agua, por aspersión antes de la colocación del túnel y por goteo una vez colocado. El riego se realizó según balance hídrico. Se han marcado las fechas de siembra de cada campaña con siembra 1 (1ª campaña), siembra 2 (2ª campaña) y siembra 3 (3ª campaña) con flechas verdes. Se observa claramente cómo hay bastante diferencia entre la lluvia otoño-invernal que recibieron las plantas en crecimiento en cada campaña. Durante la primera campaña (2004) las lluvias fueron abundantes en los meses de siembra (octubre-diciembre). Durante el 2005 estos aportes fueron muy escasos y durante el 2006 fueron menores en cantidades máximas alcanzadas que en el 2004 pero continuados desde principios de octubre hasta abril. Se hace evidente que las remolachas de la segunda campaña sufrieron un perfil hídrico del suelo con menos recursos durante los primeros meses de crecimiento.

Estos resultados permiten poner el punto de atención en el agua recibida durante la fase joven del cultivo, de forma que cultivos con una buena disponibilidad hídrica durante esta fase del crecimiento son más productivos (campañas 1 y 3) y resisten mejor los golpes de calor (campaña 3 en comparación con la campaña 2). Este dato es importante para el agricultor ya que en ausencia de lluvias sería de gran interés para la producción y la resistencia de la planta al calor, una programación de los riegos en la fase temprana de desarrollo.

### **3.1.5. Correlaciones encontradas en los ensayos de túneles en cada campaña entre los parámetros climáticos y agronómicos.**

---

Se realizó un análisis de correlaciones de Pearson entre las diferentes variables obtenidas. Se han seleccionados aquellas correlaciones importantes:  $n > 4$ ,  $|r| > 0,5$  y significación  $< 0,05$ . Se compararon los diferentes parámetros agronómicos con los datos climáticos en el ensayo de los túneles. Los resultados se muestran en la tabla 1.5.

En general, durante la primera campaña, la mayoría de los parámetros agronómicos muestran correlaciones significativas con alguna de las temperaturas máxima, media o mínima además de con la evapotranspiración potencial calculada (EToC). En la segunda (2005) y tercera campaña (2006) existen muy pocas correlaciones entre los parámetros agronómicos y las temperaturas. En el 2005 ningún parámetro muestra correlación con las  $T^a$  máximas alcanzadas.

En cuanto a la producción de materia en general se observa que la mayoría de los parámetros relacionados con el crecimiento de la planta muestran durante la campaña del 2004, correlaciones significativas con la temperatura máxima, media y mínima y con la

evapotranspiración potencial. Durante las dos campañas posteriores, ningún parámetro relacionado con la producción muestra correlaciones con la temperatura máxima.

Solo la evapotranspiración potencial mantiene relación con la mayoría de los parámetros de producción, por lo que se podría deducir que bajo las condiciones de los túneles, es la acción combinada de los parámetros climáticos (calculada aquí como la demanda evapotranspirativa de la atmósfera) la que regula el comportamiento productivo de la raíz. Los parámetros relacionados con la producción de hojas sólo muestran correlación con la ETo durante el 2004. De los parámetros relacionados con la producción es la producción de materia seca de raíz (ProdMSRaíz) la que mayor índice de correlación presenta ( $r$ ). Cabría esperar una correlación significativa entre la ETo y la producción de azúcar (Az/Ha). Esta relación sólo se da durante el 2005 (sign.<0,001), donde la producción de azúcar también se relaciona con la Tª mín (sign.<0,01).

Respecto a los parámetros relacionados con el **contenido hídrico**, en las campañas 2004 y 2006 existe una buena relación entre la ETo y gran parte de los parámetros que representan el estado hídrico de la planta. En el 2006 hay además una buena relación de estos parámetros con la humedad relativa mínima (HR min). En el 2005 no ocurre así. El golpe de calor de esta campaña junto con el déficit hídrico del suelo, tuvo un efecto bastante inmediato sobre las hojas: produjo una importante defoliación. Las escasas hojas que se iban desarrollando bajo T3 tenían mayor % de materia seca que las del control. Las plantas de T3 no alcanzan la producción foliar del control hasta el final de la cosecha, cuando las plantas control empiezan a desprenderse también de sus hojas. Frente a esta diferencia en las condiciones exteriores y en producción foliar, las raíces de los tres tratamientos muestran valores similares de brix (% de sacarosa). Las plantas bajo el túnel desarrollan una serie de respuestas de emergencia (defoliación, mantenimiento de la riqueza del órgano de reserva para asegurar la reproducción) que se interpretan mejor desde la perspectiva de umbrales que desde la correlación lineal. En este sentido es esperable lo observado en la tabla 1.5 para la 2ª campaña, que no haya correlaciones.

En cuanto a la **nutrición nitrogenada**, cabe señalar que el contenido de nitrógeno posee dos componentes, por un lado la disponibilidad de este elemento por parte de la planta y por otro, un componente relacionado con el desarrollo del cultivo. En condiciones normales, el contenido en nitrógeno va disminuyendo a lo largo del ciclo de la planta y esto podría estar relacionado con elementos climáticos que varían a lo largo de dicho ciclo, como la Tmed, Tmin, Tmax, HRmin o la EToC. Este comportamiento queda reflejado en los valores de la primera campaña (datos no mostrados), donde la cantidad de nitrógeno nítrico y total en cada órgano, va disminuyendo al hacerse más extremas las condiciones (aumento de temperatura y de ETo). En la 2ª y 3ª campaña no fueron medidos estos parámetros.

Respecto a la calidad de la remolacha, de los cuatro parámetros que se muestran (Tabla 1.5, 4-RAAmino, 4-Polarización, 4-Potasio, 4-Sodio), el N-α amino en la raíz, la cantidad de potasio y

la cantidad de sodio, disminuyen la capacidad de recuperar la sacarosa del jugo de la raíz. La polarización es una medida de la riqueza de en sacarosa. El N- $\alpha$  amino mide la cantidad de N de aminoácidos presente y suele disminuir su cantidad hasta finales de abril y a partir de los 2500 grados días comienza a acumularse hasta recolección (Echevarría & Morillo-Velarde 2005).

En la primera campaña, donde casi no existió efecto túnel, estos parámetros están relacionados con las condiciones climáticas (Tabla 1.5, 4-RAAmino, 4-Polarización, 4-Potasio, 4-Sodio; 2004). Las condiciones de mayor temperatura y demanda evaporativa, aumentan la cantidad de alfa-aminos y la polarización (Tabla 1.5, 4-RAAmino, 4-Polarización; 2004, ETo). El sodio y el potasio disminuyen (Tabla 1.5, 4-Potasio, 4-Sodio; 2004, ETo). Estas altas correlaciones podrían estar más relacionada con el desarrollo normal del ciclo, por su componente de desarrollo, que por una acción directa o individual de los diferentes elementos climáticos. En condiciones normales, la polarización de la remolacha va aumentando en paralelo a la ETo.

En las otras dos campañas no se dan estas correlaciones, y si se dan, como en el caso del potasio y el sodio en el 2005 o en el 2006 con la EToC (Tabla 1.5 4-RAAmino, 4-Polarización, 4-Potasio, 4-Sodio; 2005,2006) muestran un r menor que en la primera campaña.



**Tabla 1.5.** Correlaciones entre los parámetros agronómicos y climáticos en el ensayo con túneles a lo largo de las tres campañas. Los parámetros se han agrupado en función de los aspectos fisiológicos de la planta con los que estén relacionados: producción, contenido hídrico, nutrición, calidad. Todas las correlaciones muestran una significación  $< 0,05$ . El valor numérico corresponde al coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ).

		2004					2005			2006				
	PARÁMETROS	ETo C	HR min	T <sup>a</sup> max	T <sup>a</sup> med	T <sup>a</sup> min	ETo C	T <sup>a</sup> med	T <sup>a</sup> min	ETo C	HR min	T <sup>a</sup> max	T <sup>a</sup> med	T <sup>a</sup> min
PRODUCCIÓN	1-Az/Ha						0,66		0,55		-0,59			
	1-Cobertura	-0,69		-0,73	-0,75	-0,62								
	1-Hojas/Planta													-0,67
	1-LAI			-0,62	-0,57	-0,55								
	1-Prod Hojas	-0,53		-0,62	-0,61									-0,59
	1-ProdMSPlanta	0,88	-0,92	0,85	0,86	0,81	0,68			0,84	-0,66			
	1-ProdMSRaiz	0,90	-0,91	0,92	0,91	0,88	0,70		0,54	0,79	-0,73			
	1-Prod Planta	0,54		0,55	0,52	0,61	0,56			0,75				
	1-Prod Raíz	0,83	-0,87	0,89	0,85	0,90	0,66		0,51	0,78	-0,60			
CONTENIDO HÍDRICO	2-BRIX	0,83	-0,91	0,73	0,76	0,60				0,61	-0,70			0,54
	2-Contenido Hídrico													-0,54
	2-LBrix							0,89				1,00		
	2-PBrix	0,78	-0,91	0,65	0,66					0,67	-0,84			
	2-%MSH	0,84		0,77	0,82	0,61				0,60	-0,80			
	2-%MSL	0,77		0,72	0,77	0,59				0,61	-0,60	0,53		
	2-%MSP	0,88	-0,78	0,80	0,85	0,64				0,59	-0,80			
	2-%MSR	0,81	-0,80	0,68	0,76	0,54	0,52			0,68	-0,74			
	2-SFEMS	-0,53								-0,78	0,65			
NUTRICIÓN	2-SFEPPF	0,78		0,84	0,85	0,80							0,64	0,78
	3-NNJUPeciolo	-0,87		-0,89	-0,87	-0,85								
	3-NNMsPeciolo	-0,76	0,88	-0,80	-0,76	-0,71								
	3-NTLimbo	-0,60			-0,58	-0,65								
	3-NTPeciolo													
CALIDAD	3-NTRaíz	-0,64		-0,68	-0,67	-0,65								
	4-RAAmino	0,50		0,52	0,56					-0,61	0,62			
	4-Polarización	0,77	-0,85	0,73	0,78	0,67								
	4-Potasio	-0,82	0,77	-0,83	-0,83	-0,87	-0,56		-0,72					
	4-Sodio	-0,80	0,76	-0,78	-0,76	-0,77	-0,59			-0,60	0,70			

### 3.1.6. Correlaciones encontradas en los ensayos entre los parámetros climáticos y agronómicos: análisis conjunto de las tres campañas.

Se realizó un análisis de correlaciones de Pearson entre las diferentes variables obtenidas. Se han seleccionados aquellas correlaciones importantes:  $n > 4$ ,  $|r| > 0,5$  y significación  $< 0,05$ . Se indica en las tablas cuando las significaciones son aún mayores que las estándar.

#### 3.1.6.1. La temperatura

Cabe destacar que son las temperaturas mínimas y las medias, las que presentan un mayor número de relaciones. Las mínimas se correlacionan de forma directa con parámetros relacionados con el contenido en materia seca de la raíz (azúcar por hectárea y producción de masa seca de la raíz) y de forma inversa con el potasio de la raíz.

Las temperaturas medias se relacionan de forma directa con la producción de raíz y la materia seca de raíz e inversamente con la producción de hojas.

**Tabla 1.6.** Correlaciones entre los diversos parámetros agronómicos y los parámetros de temperatura analizando los datos de las tres campañas de forma agrupada. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP(r) Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $< 10^{-5}$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
TªMIN	Potasio	-0,592	93
TªMIN	Azúcar/Ha	0,531	92
TªMIN	Prod MSR	0,509	82
TªMEDIA	ProdR	0,551	59
TªMEDIA	ProdH	-0,543	59
TªMEDIA	Prod MSR	0,506	82

#### 3.1.6.2. La ETo: una medida de la demanda hídrica

La evapotranspiración de referencia se correlaciona de forma directa y muy importante con el brix de la raíz (Tabla 1.7). Cabe destacar que para ETo acumulada (EToC a 2, 2+4 y 2+4+6 días acumulados) las medidas de ETo aumenta el valor de la correlación, adquiriendo el coeficiente de Pearson(r) el mayor valor con la ETo a los 6 días (Tabla 1.7, línea 1). Esto indicaría que los cambios en el brix producidos por las variaciones de ETo mostrarían el historial del estado hídrico de la planta, al menos a seis días del suceso.

El brix del peciolo (PBrix) también presenta correlaciones directas con la ETo (Tabla 1.7, líneas 5, 6, 7) pero con coeficientes menores que en el caso del brix de la raíz y en el caso del peciolo no presenta el efecto acumulativo que se distingue en el brix de raíz. El brix del peciolo muestra su máximo con ETo acumulado de 2 días. El brix del peciolo también mostraría este efecto memoria del brix de la raíz pero a más corto plazo, dos días.

La producción de raíz (ProdR) también presenta importantes correlaciones con la ETo, siendo mayor el valor de  $r$  en la ETo calculada y disminuyendo con el efecto acumulado. La cantidad de raíz producida muestra una mayor correlación con la EToC inmediata y disminuye ligeramente con la EToC acumulada indicando un efecto inmediato de las variaciones de ETo sobre la producción de raíz. Hay que tener en cuenta que este parámetro se refiere a la producción de masa fresca y las variaciones hídricas influyen en la producción de forma importante.

**Tabla 1.7.** Correlaciones entre los diversos parámetros agronómicos y los parámetros de evapotranspiración potencial calculada (EToC) durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. BRIX: Brix de la raíz, PBrix: Brix del peciolo, ProdR: Producción de raíz. Se muestran sombreadas las correlaciones más altas para cada parámetro. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-7}$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
EToC6d	BRIX	0,704	105
EToC4d	BRIX	0,697	105
EToC2d	BRIX	0,677	105
EToC	BRIX	0,583	105
EToC2d	PBrix	0,551	97
EToC4d	PBrix	0,533	97
EToC6d	PBrix	0,527	97
EToC	ProdR	0,680	105
EToC2d	ProdR	0,678	105
EToC4d	ProdR	0,659	105
EToC6d	ProdR	0,633	105

### 3.1.6.3. Integral térmica: Una medida del desarrollo del cultivo

Este parámetro está ampliamente correlacionado con los parámetros agronómicos del cultivo. Refleja las unidades de calor, medido en GDÍA, que ha recibido la planta hasta un momento determinado. Se han calculado los grados días diarios y acumulados a 2, 4 y 6 días. La mayoría de los parámetros se correlacionan con las cuatro medidas. En la tabla se mostrarán solamente los grados día que presenten mayor  $r$ .

En la tabla 1.8 se muestra que la integral térmica se correlaciona de forma directa con los parámetros agronómicos de la raíz que están relacionados con la acumulación de materia seca (el brix de la raíz: BRIX, la polarización, la cantidad de sacarosa: Azúcar/Ha, el % de materia seca de la raíz: %MSR y la producción de materia seca de la raíz: Prod MSR y producción de raíz: ProdR) relacionada a su vez con una maduración de los tejidos que disminuyen su contenido hídrico y con la acumulación de sacarosa propia de la raíz de la planta.

También encontramos correlación de la integral térmica con parámetros foliares. En el caso de la producción de hojas y la superficie foliar específica (SFEMS), la relación es inversa. Pero para los parámetros relacionados con la materia seca de la hoja, es directa: % de materia seca de hojas, peciolo y limbo (%MSH, %MSP y %MSL respectivamente, en tabla 1.8)

Cabe destacar la relación inversa con el potasio y con el nitrógeno nítrico en peciolo (NNJUP).

**Tabla 1.8.** Correlaciones entre los diversos parámetros agronómicos y los parámetros de la integral térmica (GDIA) durante las tres campañas. MSL: materia seca de limbo; MSH: materia seca de hojas; SFEMS: Superficie foliar específica en materia seca; MSP: Materia seca de planta; NNJUP: Nitrógeno nítrico en jugo de peciolo. Las referencias 4d, 6d indican los días previos que se han acumulado para obtener ese valor de GDIA. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-5}$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
GDIA	ProdH	-0,649	106
GDIA	BRIX	0,690	105
GDIA	Polarización	0,614	93
GDIA4d	Potasio	-0,514	93
GDIA4d	Azúcar/Ha	0,584	92
GDIA	%MSR	0,766	83
GDIA4d	Prod MSR	0,573	82
GDIA	%MSP	0,711	81
GDIA	%MSH	0,710	80
GDIA	%MSL	0,673	80
GDIA	SFEMS	-0,532	65
GDIA	ProdR	0,665	59
GDIA6d	NNJUP	-0,595	52

#### 3.1.6.4. LAI: Una medida del desarrollo foliar

El LAI indica la superficie total de hojas por unidad de superficie de suelo. Es un índice del vigor del follaje de las plantas. Un mayor LAI indica mayor cantidad de hojas superpuestas, mayor

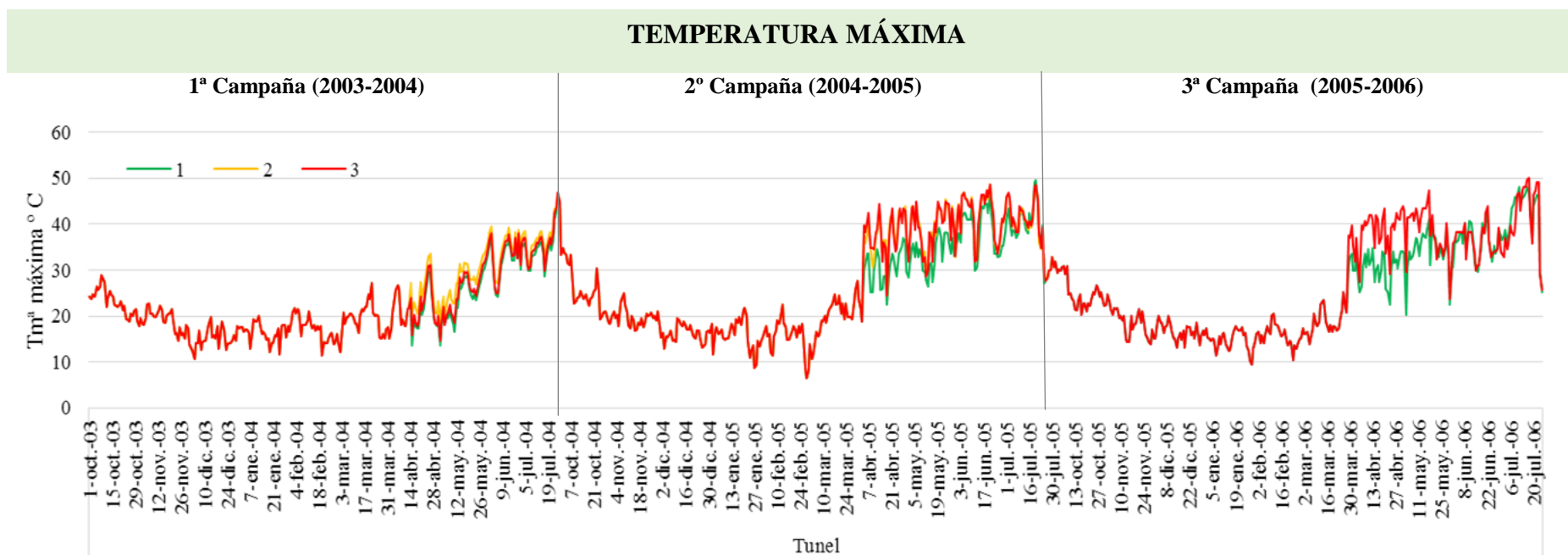
producción foliar. Por eso se presenta altamente correlacionado con la producción de hojas y de materia seca de hojas (Prod MSH). Pero se relaciona inversamente con el porcentaje de materia seca de hojas y peciolo (%MSH, %MSP), ya que el aumento del porcentaje de la materia seca está asociado con pérdida de agua y en estas condiciones las plantas de remolacha tienden a disminuir la superficie fotosintéticamente activa. La correlación es positiva con la superficie foliar específica por masa seca (SFEMS, relación entre superficie foliar y materia seca foliar).

Es muy interesante la correlación negativa de este parámetro con la prolina de raíz y el nitrógeno alfa amino (parámetros de los que hablaremos más adelante). En condiciones de déficit hídrico la planta de remolacha disminuye su LAI y aumenta el contenido en prolina y otros osmolitos compatibles en la raíz.

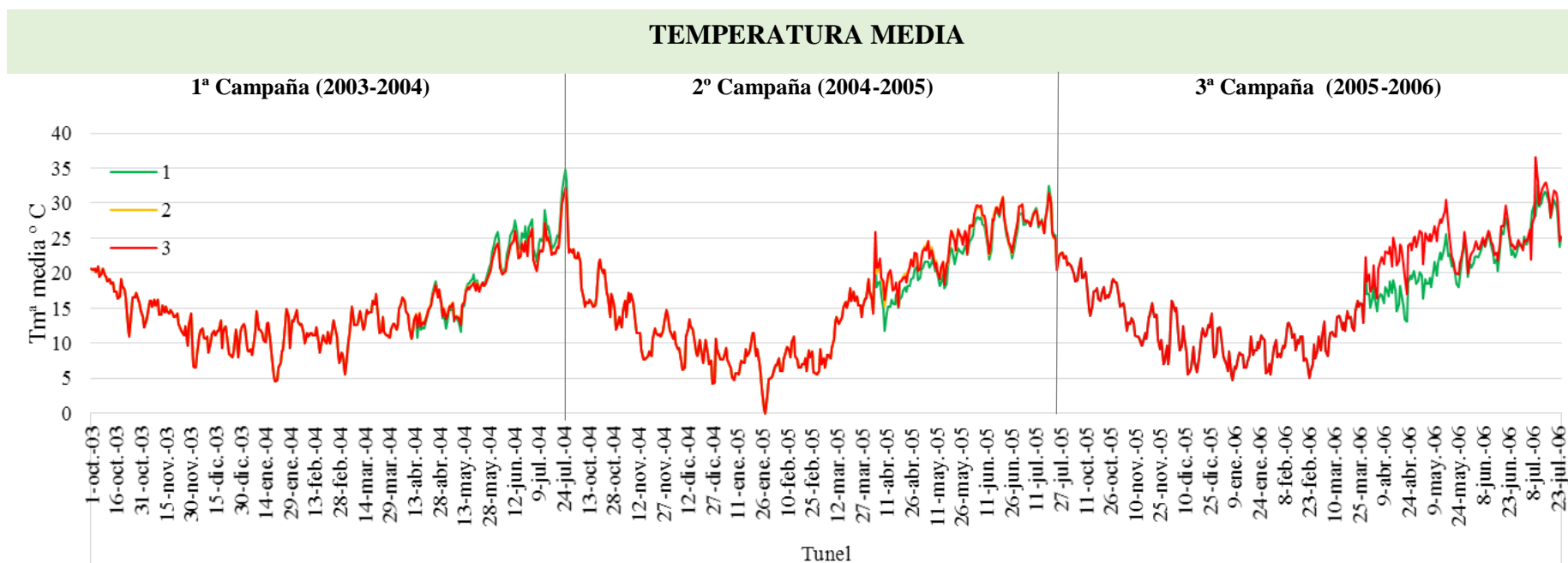
**Tabla 1.9.** Correlaciones entre los diversos parámetros agronómicos y el Índice de Área Foliar (LAI) durante las tres campañas. MSL: materia seca de limbo; MSH: materia seca de hojas; SFEMS: Superficie foliar específica en materia seca. MSP: Materia seca de planta; Ugpf: unidades por gramo de peso fresco;  $\alpha$ -amino: Nitrógeno en forma de  $\alpha$  amino en la raíz. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-7}$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
LAI	ProdH	0,935	78
LAI	ProdMSH	0,901	78
LAI	%MSL	-0,664	78
LAI	%MSH	-0,651	78
LAI	SFEMS	0,637	78
LAI	%MSP	-0,609	78
LAI	Prod Planta	0,668	77
LAI	Prolina-raíz-Ugpf	-0,588	76
LAI	$\alpha$ -Amino	-0,600	72

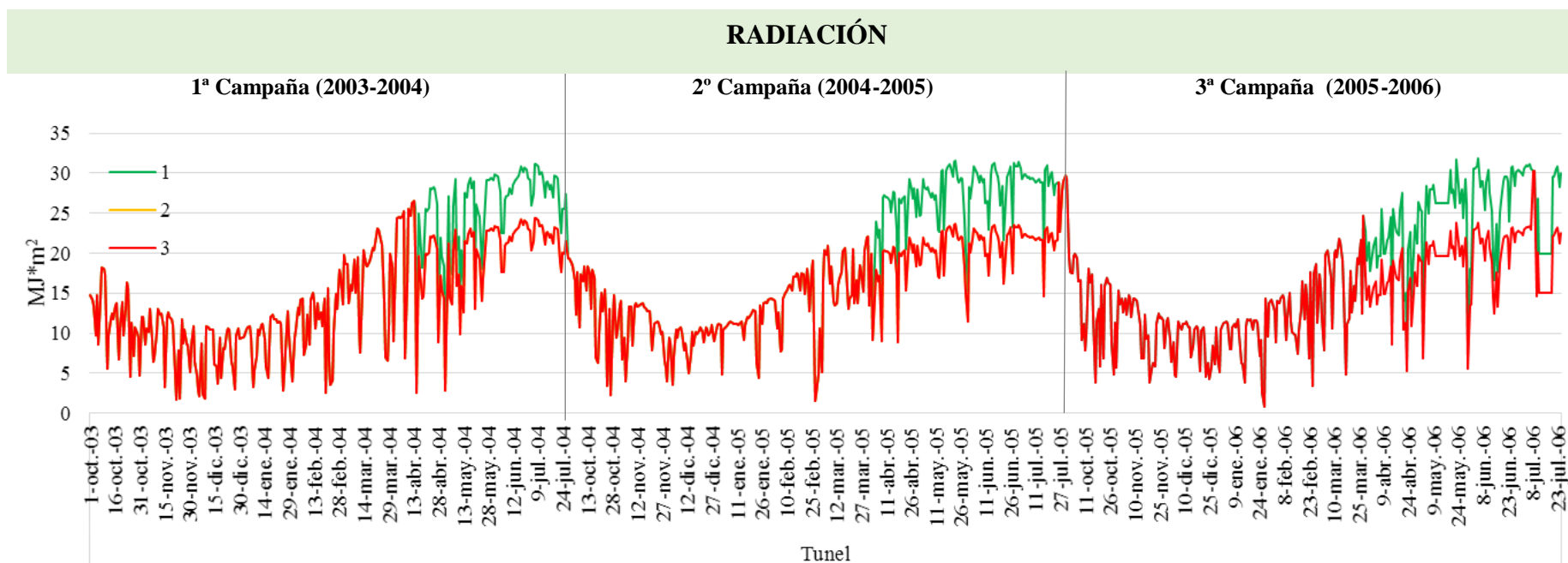
Colectivamente estos resultados permiten concluir que un análisis de los datos agrupados de las tres campañas permite destacar correlaciones de interés entre los parámetros climáticos y los parámetros agronómicos.



**Figura 1.17.** Evolución de la temperatura máxima a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente.

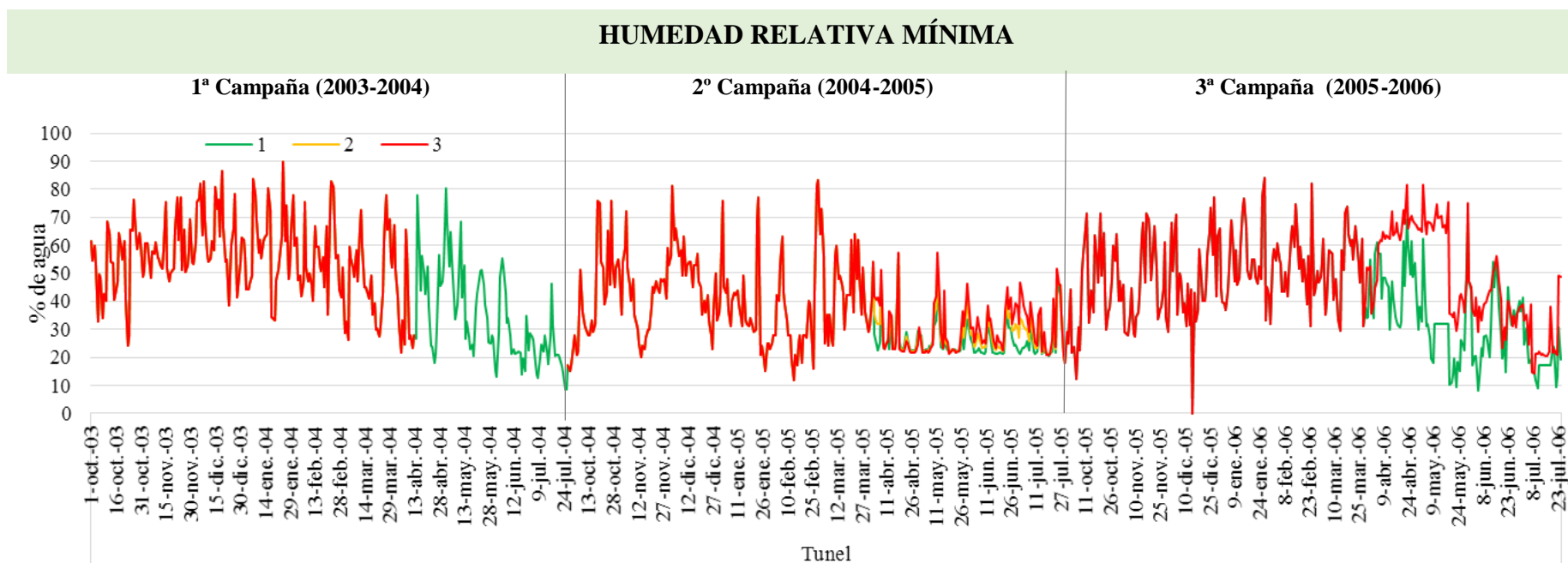


**Figura 1.18.** Evolución de la temperatura media a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente

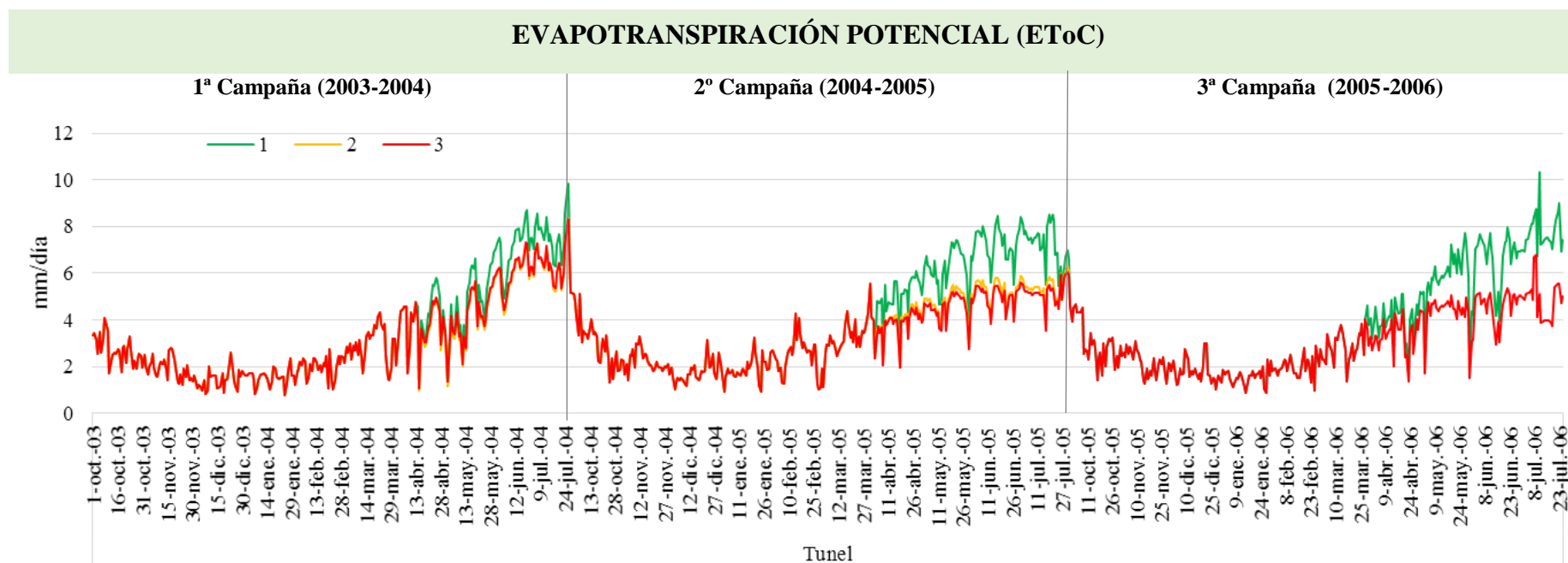


**Figura 1.19.** Evolución de la radiación solar a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente.





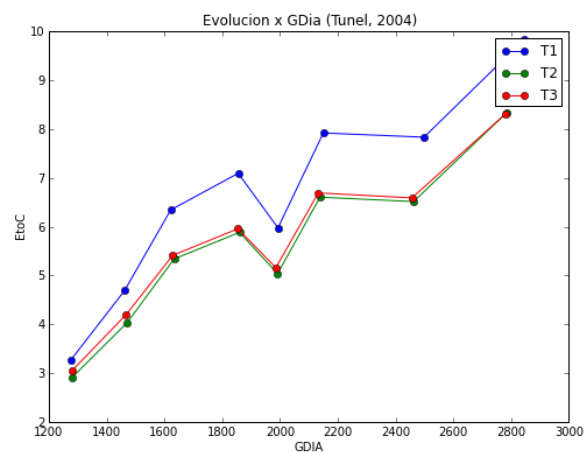
**Figura 1.20.** Evolución de la humedad relativa mínima a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente. En la campaña 3 no se pudieron recoger los datos del túnel 2.



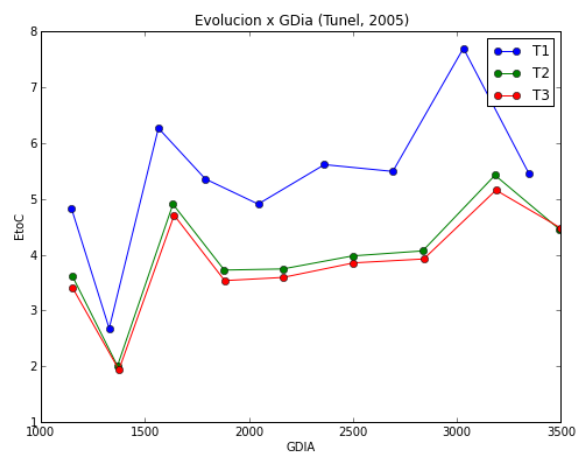
**Figura 1.21.A** Evolución de la evapotranspiración potencial a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente. En la campaña 3 no se pudieron recoger los datos del tune 2.

### EVAPOTRANSPIRACIÓN POTENCIAL RESPECTO A LA INTEGRAL TÉRMICA

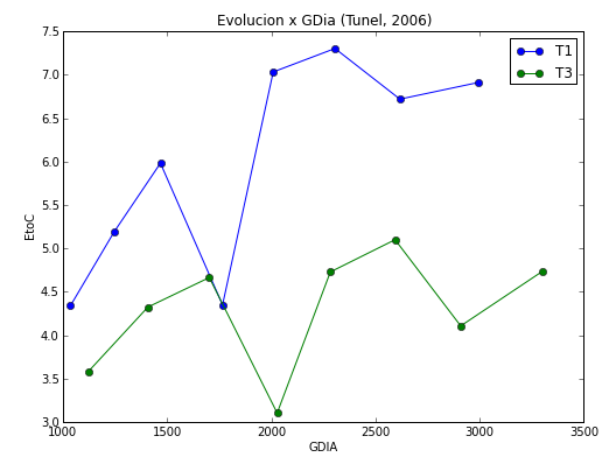
1ª Campaña (2003-2004)



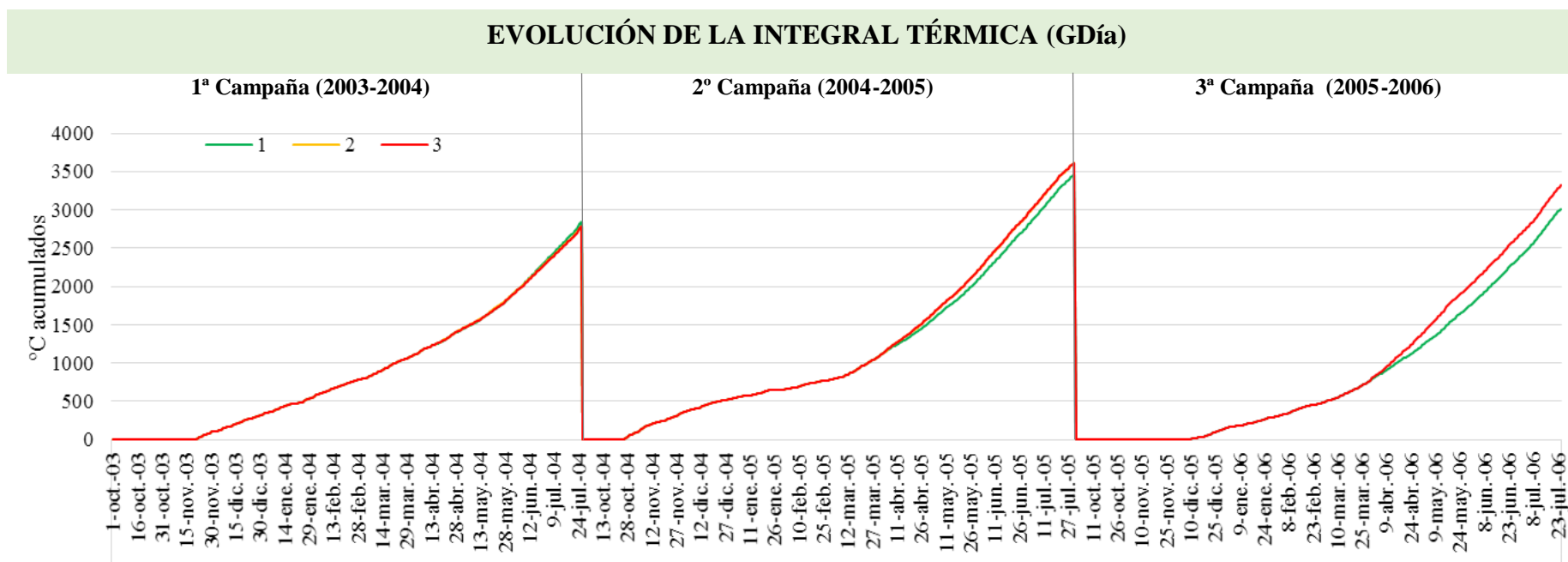
2ª Campaña (2004-2005)



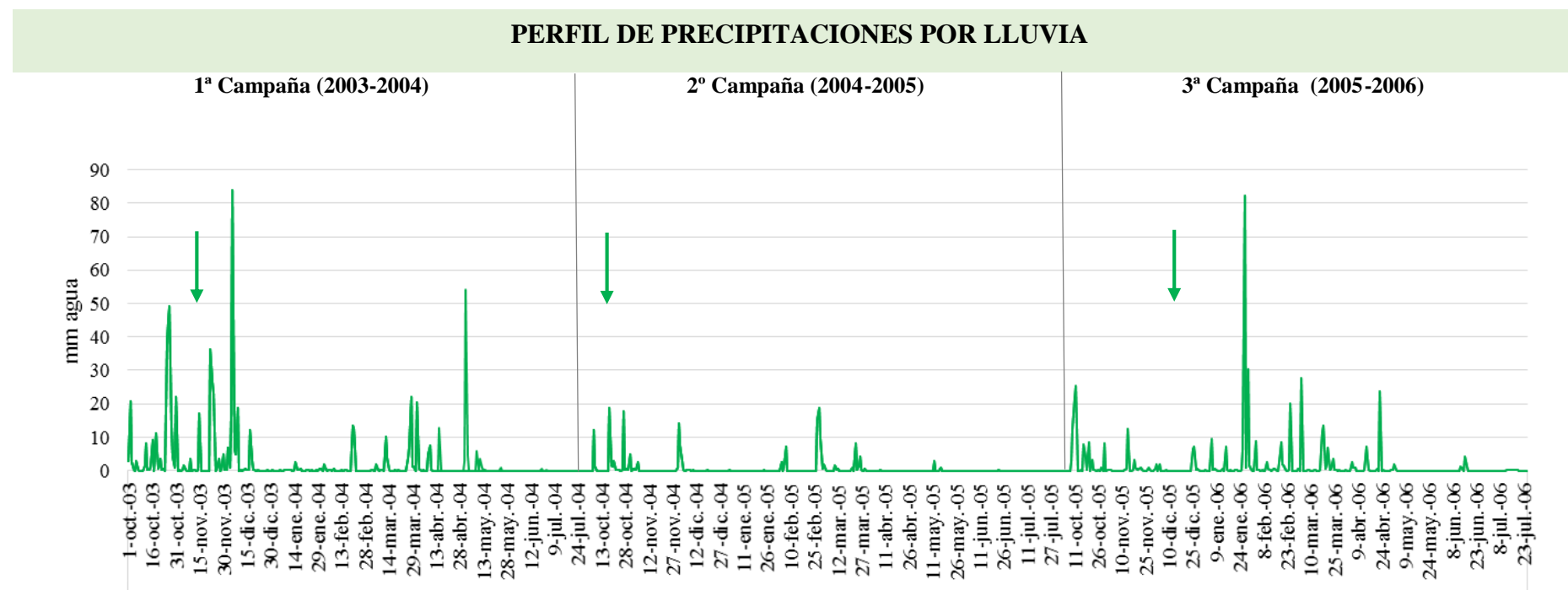
3ª Campaña (2005-2006)



**Figura 1.21.B.** Evolución de la evapotranspiración potencial calculada en cada campaña respecto a los grados día. Túnel control (azul); Túnel tratamiento intermedio (verde); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). En la campaña 3 no se pudieron recoger los datos del tune 2 y el color verde representa los datos del túnel 3.



**Figura 1.22.** Evolución de los grados días a lo largo de las tres campañas muestreadas. Túnel control (verde); Túnel tratamiento intermedio (amarillo); Túnel tratamiento plástico cerrado (rojo). Los datos se recogieron de Octubre a mediados de Julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente. En la campaña 3 no se pudieron recoger los datos del tune 2.



**Figura 1.23.** Evolución del aporte hídrico por lluvia a lo largo de las tres campañas muestreadas. Los datos se recogieron de octubre a mediados de julio. Las líneas verticales marca la finalización de recogida de datos para una campaña y el inicio para la siguiente. Las flechas verdes indican el momento de la siembra.

### **3.2. EVOLUCIÓN DE LA GLUCOSA, LA CANTIDAD DE PROTEÍNA Y LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE SACAROSA: SACAROSA SINTASA, INVERTASA NEUTRA E INVERTASA ÁCIDA EN EL ENSAYO TÉRMICO CON TÚNELES. ANÁLISIS DE LAS CORRELACIONES DE ESTAS ENZIMAS**

---

En este capítulo se presenta la evolución de la glucosa, la cantidad de proteínas y las actividades enzimáticas relacionados con el metabolismo de los carbohidratos en la raíz de la remolacha durante las tres campañas estudiadas en los ensayos de estrés térmico con túneles. Los resultados se muestran agrupados por campañas. También se analizarán las correlaciones de las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa con el resto de parámetros seguidos a lo largo del estudio: climáticos, agronómicos, metabolitos e iones. Al final se presenta un análisis global de las tres campañas en conjunto, utilizando los datos de todos los experimentos de campo realizados. Este análisis global permitirá detectar tendencias generales del funcionamiento de la planta. También se han analizado las correlaciones de todos los experimentos por campaña, para detectar variaciones en las correlaciones en función de las condiciones diferenciales de cada año agronómico.

#### **3.2.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña)**

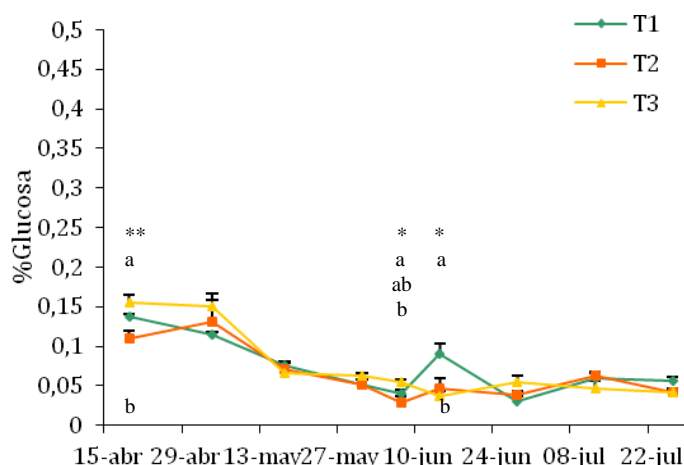
---

##### **3.2.1.1. Concentración de glucosa en la raíz**

Los azúcares reductores (glucosa y fructosa principalmente) se acumulan en circunstancias específicas del desarrollo del cultivo, como en etapas juveniles de la planta o en respuesta al estrés hídrico, y son la causa principal de pérdida de la calidad en remolachas de siembra otoñal (Echevarría & Morillo-Velarde 2005). Tanto en estudios anteriores como en éste se midió la cantidad de azúcares reductores (parámetro agronómico determinado por AIMCRA) y también la cantidad de glucosa (azúcar reductor representativo, determinado en nuestro laboratorio). Ensayos previos en los que se modificaron las condiciones de manejo del cultivo, pusieron en evidencia que es en los meses de julio y agosto cuando se producen los principales incrementos de azúcares reductores, tanto totales como de glucosa. También se vio que por encima de las condiciones de manejo del cultivo, son las condiciones climáticas anuales las que determinan la acumulación de dichos azúcares influyendo de forma determinante el riego y la variedad (Jiménez Segovia 2004). Así se vio que las cantidades de glucosa en general permanecen bajas (del orden de 0,1 g/100 gpf) durante los meses de febrero a junio y que aumentan considerablemente coincidiendo con la finalización de los riegos (valores de 2 g/100 gpf o superiores). También se observó que en cultivos de secano los valores de glucosa son superiores a los de regadío durante los meses en que el regadío recibe agua y que la acumulación de

glucosa depende de la variedad. En este sentido fue la variedad Claudia la que acumuló mayores cantidades respecto de variedades como Ramona, variedad con niveles muy bajos de azúcares reductores en cualquiera de las condiciones climáticas o de manejo del cultivo ensayadas (no superiores a 0,5 g/100 gpf). En este estudio hemos abordado la influencia del golpe de calor en la acumulación de glucosa.

En esta 1ª campaña la acumulación de glucosa en la raíz, mostró un comportamiento similar en los tres tratamientos (Fig. 2.1). Los niveles de glucosa se mantienen por encima del 0,1% hasta mediados de mayo y desciende en el tercer muestreo por debajo del 0,1%. A partir de esta fecha los niveles de glucosa se mantienen por debajo de este umbral para las tres condiciones, alcanzando en el último muestreo niveles mínimos de 0,05 g/100 gpf. En el 6º muestreo (14 de junio) el control muestra niveles superiores de glucosa respecto a los tratamientos. En general, respecto a valores registrados en campañas anteriores estos niveles de glucosa pueden considerarse muy bajos y similares a los de la variedad Ramona (Jiménez Segovia 2004), de hecho, la variedad Dax utilizada en este estudio es también una variedad que se caracteriza por la producción de bajas cantidades de azúcares reductores.

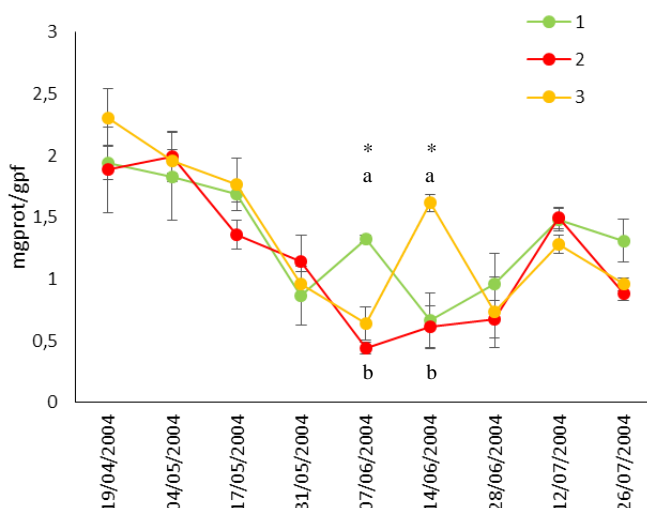


**Figura 2.1.** Evolución de la cantidad de glucosa a lo largo del ensayo térmico. T1 (-♦-) muestra las condiciones control, T2, (-■-) Túnel completo T3 (-▲-) el túnel con ventilación. Las barras de error muestran media  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ .

### 3.2.1.2. Cantidad de proteína

La concentración de proteína varió a lo largo del ensayo y en algunos puntos entre los distintos tratamientos. En general, muestra un perfil descendente hasta el 5º muestreo en el que aumenta la cantidad de proteína. En el 5º y 6º hay diferencias de comportamiento entre T1 y T3 y a partir del 7º muestreo los tres tratamientos muestran un comportamiento similar y en ascenso. En cuanto a

diferencias entre tratamientos, el control T1 muestra un comportamiento diferente a T2 y T3 estadísticamente significativo en el muestreo 5º del 7 de junio. El túnel ventilado (T3) muestra diferencias significativas con las otras dos condiciones en el siguiente muestreo, muestreo 6º, donde se aprecia un aumento de la cantidad de proteína en esta condición. El túnel sin ventilación (T3) presenta sus contenidos mínimos precisamente en este 5º y 6º muestreo. En su conjunto estos datos muestran que excepto los muestreos señalados no hay diferencias significativas en la cantidad de proteínas entre el control y las parcelas cubiertas con los túneles.



**Figura 2.2.** Cantidad de proteína obtenida durante la primera campaña. T1 (—♦—) muestra las condiciones control, T2, (—■—) Túnel completo T3 (—▲—) el túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

### 3.2.1.3. Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la primera campaña (2003-2004).

En los gráficos de la figura 2.3 se muestra la evolución de estas actividades enzimáticas, totales y específicas, en los diferentes tratamientos a lo largo del periodo de estudio.

De las enzimas analizadas en la raíz de remolacha, es la **sacarosa sintasa (SS)** la que presenta mayor actividad en todos los tratamientos para el periodo muestreado, llegando a máximos de 2,4 U/mg prot (Fig. 2.3B). Le sigue la **invertasa neutra (IN)** (0,11 U/mg prot; Fig. 2.3D), y la que menor actividad presenta es la **invertasa ácida (IA)** (0,054U/mg prot) (Fig. 2.3F). Esta es la distribución general encontrada también en estudios anteriores (Jiménez Segovia 2004) para estas actividades enzimáticas.

#### 3.2.1.3.1. Evolución de la actividad Sacarosa Sintasa (SS)

La **actividad total** de la SS muestra un descenso desde los primeros muestreos en abril hasta mediados de junio (6º muestreo) en el que la actividad llega a la mitad de los valores iniciales (de 2

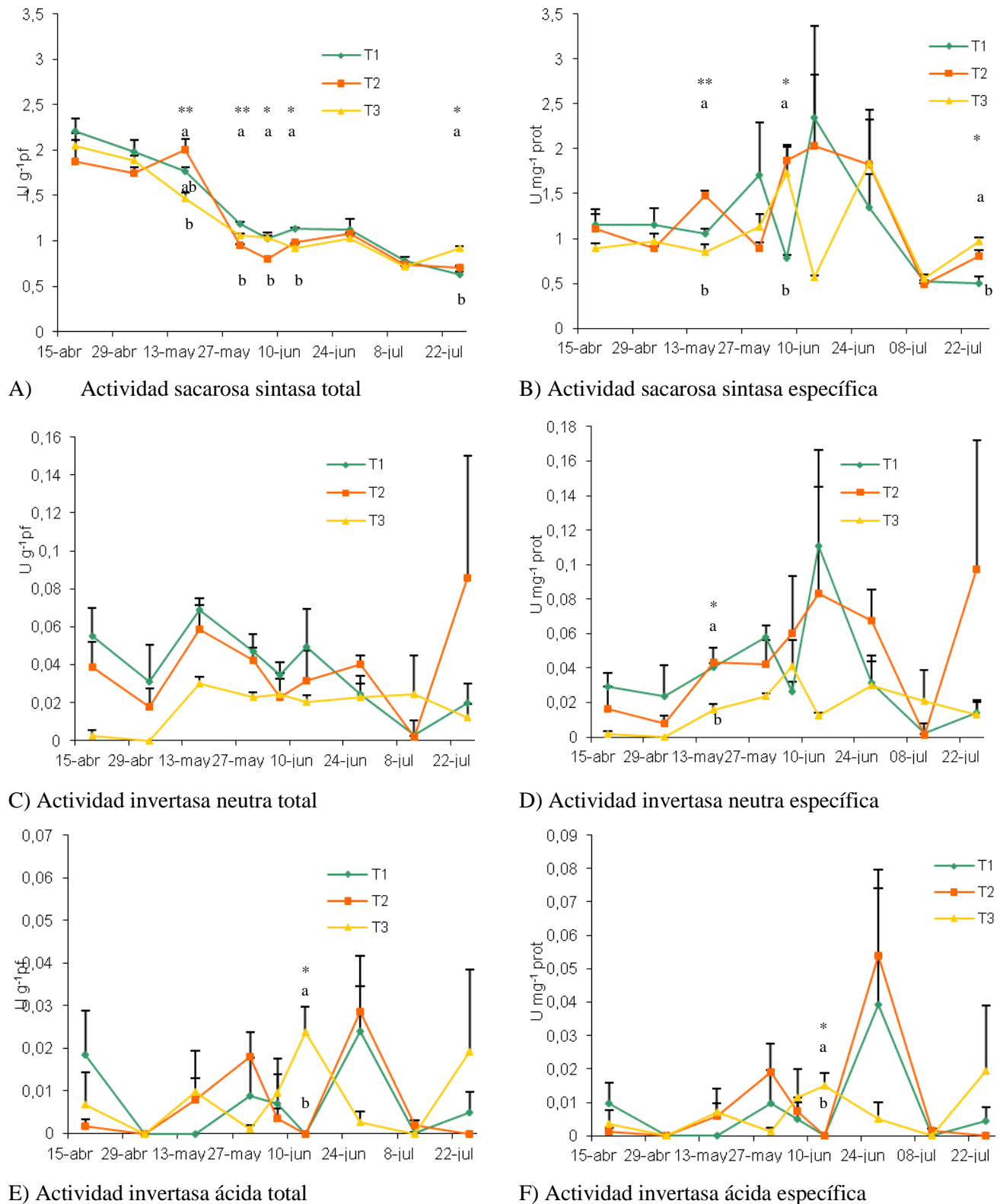


U/mg prot a 1 U/mg prot). En este momento se estabilizan, alcanzándose los valores más bajos en los dos últimos muestreos (12 y 26 de junio).

En cuanto a la diferencia entre los tratamientos, se observan diferencias significativas entre el control (T1) y el túnel sin ventilación (T2) en los muestreos 4º, 5º y 6º (finales de mayo hasta mediados de junio) permaneciendo la actividad en el control por encima de la del túnel sin ventilación. En el 3º muestreo (17 de mayo) y en el último (26 de julio) es el túnel ventilado el que presenta diferencias significativas respecto a los otros dos, con valores más bajos en mayo y más altos en julio.

La **actividad SS específica** (U/mg prot) presenta gran variabilidad en los muestreos 4º, 5º y 6º. Hay diferencias significativas entre los tratamientos en el muestreo 3º, 5º y 9º. En el muestreo 3º (4 de mayo) el túnel sin ventilación presenta mayores valores que los otros dos. En el muestro 5º (7 de junio) el control presenta valores mucho más bajos que los otros dos tratamientos, del orden de 2,4 veces más pequeños. En el muestreo 9º el control vuelve a estar por debajo, con menores diferencias, (1, 6 veces menor). Un análisis global de la **actividad SS específica** pone también de manifiesto que los tratamientos control (T1) y sin ventilación (T2) muestran sus máximos de actividad el 14 de junio. El tratamiento ventilado (T3) mantiene niveles más bajos, alcanzando su máximo de actividad el 28 de junio. Los valores dentro del túnel sin ventilación (T2) permanecen más tiempo con niveles más altos y presentan menores oscilaciones. La actividad SS específica en el control (T1) presenta oscilaciones de mayor amplitud. Los mínimos de todos los tratamientos se manifiestan el 12 de julio.

En general, el perfil de la actividad SS específica nos muestra un incremento de actividad en los muestreos de final de mayo y junio y muestra también valores muy variables debido probablemente a que la cantidad de proteína resultó ser muy variable en estos muestreos (Fig. 2.2).



**Figura 2.3.** Evolución a lo largo de los muestreos de las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa durante la primera campaña (2003-2004). A) Sacarosa sintasa (SS) total; B) SS específica; C) Invertasa neutra (IN) Total; D) IN específica; E) IA total; F) IA específica. T1 (—◆—) muestra las condiciones control, T2, (—■—) Túnel completo, T3 (—▲—) el túnel con ventilación. Las barras de error muestran media  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ . (\*\*)  $p < 0,01$ , diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

### 3.2.1.3.2. Correlaciones de la actividad SS durante la primera campaña (2003-2004)

En la tabla 2.1 se muestran las correlaciones de la actividad SS. Son muy numerosos los parámetros agronómicos y climáticos que presentan correlaciones importantes con la actividad SS durante el 2004. En cuanto a los parámetros climáticos y agronómicos, la **actividad sacarosa sintasa disminuye** cuando:

- Aumenta la temperatura máxima, media o mínima (filas 1-3)
- Disminuye la humedad relativa (filas 4-6)
- Aumentan los grados día (desarrollo del cultivo) o la presión ambiental (filas 7-14).
- Aumenta la producción de raíz y de planta en peso total o materia seca y el brix de la raíz (filas 15-24)
- Disminuye la producción foliar y los contenidos en nitrógeno, el contenido en Na y K. (filas 25-33)

Para esta campaña, la SS tiene correlaciones positivas con la actividad invertasa neutra y con la glucosa acumulada en la raíz (filas 34 y 35). En las condiciones de esta primera campaña, las actividades de ambas enzimas podrían estar coordinadas por la misma señal.

Durante esta primera campaña la actividad SS está asociada a los momentos de crecimiento del cultivo, cuando es necesario desarrollar los órganos fotosintéticos. La SS disminuye cuando la planta entra en el momento de acumulación de la raíz, de más estrés hídrico y de pérdida de hojas.

**Tabla 2.1.** Correlaciones entre la actividad SS total y específica y los parámetros climáticos y agronómicos durante la primera campaña 2003-2004. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del ensayo térmico. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes. Las abreviaturas están definidas en el apartado Abreviaturas.

	VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
1	<b>T min</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,948*****</b>	<b>24</b>
2	<b>T media</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,868*****</b>	<b>24</b>
3	<b>T max</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,823*****</b>	<b>24</b>
4	HR media	SS-U/gpf	0,715****	24
5	HR min	SS-U/gpf	0,734*	8
6	HR max	SS-U/gpf	0,766*	8
7	<b>GDIA</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,887*****</b>	<b>24</b>
8	<b>GDIA6d</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,886*****</b>	<b>24</b>

9	GDIA4d	SS-U/gpf	-0,852*****	24
10	GDIA2d	SS-U/gpf	-0,852*****	24
11	EToC6d	SS-U/gpf	-0,881*****	24
12	EToC4d	SS-U/gpf	-0,855*****	24
13	EToC2d	SS-U/gpf	-0,775*****	24
14	EToC	SS-U/gpf	-0,778****	24
15	Prod Raíz	SS-U/gpf	-0,874*****	24
16	Prod MSRaíz	SS-U/gpf	-0,865*****	24
17	Prod MSPlanta	SS-U/gpf	-0,839*****	23
18	Polarización	SS-U/gpf	-0,678***	24
19	%MSP	SS-U/gpf	-0,661***	23
20	Prod Planta	SS-U/gpf	-0,635***	24
21	%MSH	SS-U/gpf	-0,632**	23
22	SFE PF	SS-U/gpf	-0,629**	23
23	%MSL	SS-U/gpf	-0,604**	23
24	BRIX	SS-U/gpf	-0,536**	24
25	LAI	SS-U/gpf	0,550**	23
26	Cobertura	SS-U/gpf	0,556**	24
27	N Total Limbo	SS-U/gpf	0,537*	20
28	Prod Hojas	SS-U/gpf	0,560**	24
29	NN MS Peciolos	SS-U/gpf	0,617**	20
30	NT Raíz	SS-U/gpf	0,629**	21
31	NNJUP	SS-U/gpf	0,832*****	23
32	Sodio	SS-U/gpf	0,712****	24
33	Potasio	SS-U/gpf	0,844*****	24
34	IN- U/mgprot	SS-U/mgprot	0,708****	26
35	Glucosa- U/gpf	SS-U/gpf	0,821****	27

### 3.2.1.3.3. Evolución de la actividad Invertasa Neutra (IN)

En cuanto a la **actividad IN total**, presenta perfiles y valores dentro del rango de los obtenidos en otras campañas (0,05-0,1 U/gpf). Los valores más altos para las tres condiciones de manejo se alcanzan en el 3º muestreo (17 de mayo) (Fig. 2.3.C). En general el túnel con ventilación (T3) presenta valores más bajos a lo largo de los muestreos que el control (T1) y el túnel sin ventilación (T2). El túnel sin ventilación (T2) presenta un pico de actividad y de variabilidad en el último muestreo (26 de julio). Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada fecha de muestreo.

El perfil de la actividad **IN específica** para las tres condiciones, presenta la variabilidad y los valores dentro de lo observado en otras campañas (Fig. 2.3 D), si bien, esta enzima también presenta

una zona de mayor actividad en los muestreos de final de mayo y de junio que está en relación con una menor cantidad de proteína en esas fechas del muestro (ver caída de la cantidad de proteína en dichos muestreos en figura 2.2.)

El tratamiento ventilado (T3) muestra un perfil similar al de la variedad Ramona Riego/Déficit de la campaña 2001-2002 (campaña estudiada en proyectos anteriores). Coinciden los máximos y los valores a partir de junio. No se observan en esta campaña 2003-2004 los valores más altos de abril-mayo de otras campañas para esta actividad enzimática. Esta condición (T3) presenta menor variabilidad y valores menores en general que los observados para T1 y T2. Las condiciones control (T1) y túnel sin ventilación (T2), presentan un perfil de máximos y mínimos similar a T3 pero con valores anormalmente altos respecto a campañas estudiadas, mayores que los obtenidos para campañas anteriores. Los valores más altos se manifiestan en el 6º muestreo (14 de junio) para T1 y T2. El tratamiento sin ventilación (T2) muestra un pico de actividad y de variabilidad en el último muestreo (26 de julio). En el muestreo 3º (17 de mayo) el tratamiento T3 (ventilado) presenta valores más bajos que el control y que el túnel sin ventilación con significación estadística.

Se ha comprobado en estudios llevados a cabo anteriormente en nuestro laboratorio, que hay variedades como la variedad Claudia que presenta variabilidad en la actividad invertasa neutra en los valores de verano y por el contrario variedades, como Ramona que en condiciones de riego, presenta mayores actividades en esta enzima que en condiciones de déficit hídrico (Jiménez Segovia 2004). También ha sido comprobado que la actividad de esta enzima disminuye cuando disminuye la polaridad y parece disminuir su actividad con la edad del cultivo no siendo responsable de la degradación de sacarosa en los últimos muestreos. Además su actividad no está relacionada con la cantidad de nitrógeno suministrado a la planta (Jiménez 2004).

#### 3.2.1.3.4. Correlaciones de la actividad IN durante la primera campaña (2003-2004)

Durante esta primera campaña la actividad invertasa neutra aumenta con el aumento de la actividad sacarosa sintasa específica como se muestra en la tabla 2.2 y no mostró correlaciones de interés con otros parámetros climáticos o agronómicos.

**Tabla 2.2.** Correlaciones entre la actividad IN total y específica y el resto de actividades enzimáticas durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del ensayo térmico. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001.

Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
SS-U/mgprot	IN -U/mg prot	0,708*****	26

### 3.2.1.3.5. Evolución de la actividad Invertasa Ácida (IA)

La actividad IA presenta los niveles más bajos de todas las enzimas estudiadas, tanto para la actividad total como para la específica. Los valores de actividad IA son en general en torno a la mitad de la actividad de la invertasa neutra (IN) y 5 veces menores que la actividad SS, en los límites superiores. En los límites inferiores la diferencia es aún mayor, pues la actividad IA alcanza con frecuencia un valor igual a 0.

En campañas anteriores estudiadas (2000/2001, 2001/2002) esta enzima presentó picos de actividad en julio y agosto, y los valores más altos de esta actividad se midieron en la variedad Claudia, en condiciones de déficit hídrico y de abonado en exceso alcanzando valores de 0,1 U / mg prot. (Jiménez 2004).

En nuestros ensayos, la **actividad IA total** muestra valores bajos, con algunos valores en torno a 0 para las tres condiciones y mostrando además una alta variabilidad (Fig. 2.3.E). Las condiciones control y T2 (sin ventilación) presentan su máximo de actividad en el muestreo 7º (28 de junio). En el muestreo 6º (14 de junio) T3 presenta su máximo de actividad, con diferencia estadísticamente significativa de las condiciones control (T1) y sin ventilación (T2). El tratamiento T3 (ventilado) presenta además un pico de actividad en el último muestreo (26 de julio).

La actividad **IA específica** reproduce el mismo perfil de oscilaciones y picos que la actividad total (Fig. 2.3.F). De nuevo las condiciones control y T2 (sin ventilación) presentan su máximo de actividad en el muestreo 7º (28 de junio), que además es un pico de variabilidad que también presenta T3 en el mismo muestreo. El pico de actividad no se presentó en el 7º muestreo de T3, en este tratamiento el máximo valor, aunque bajo, se dio en el muestreo 6º (14 de junio) mostrando diferencia estadísticamente significativa con las otras dos condiciones. El tratamiento T3 (ventilado) permanece con valores más bajos que las otras dos condiciones excepto en el muestro final del 22 de julio.

En otras campañas estudiadas anteriormente los perfiles de la actividad IA son similares a los obtenidos por nosotros en este estudio, sin embargo cabe destacar: i) que no se encontró una actividad excesivamente alta (del orden de 0,1 U/gpf) en ninguno de los tratamientos tal como ocurrió para la variedad Claudia en campañas anteriores tanto en condiciones de riego como de déficit hídrico, si bien estas altas actividades correspondieron a muestreos de agosto, y las últimas muestras recogidas en nuestro estudio fueron el 22 de julio y ii) que solo el tratamiento T3 (túnel ventilado) mostró un comportamiento diferente a las otros dos, con ausencia del máximo de actividad en el muestreo del 28 de junio y mayor actividad en el último muestro del 22 de julio.

Durante la primera campaña la actividad IA no muestra ninguna correlación con parámetros climáticos y agronómicos. Si muestra correlaciones con parámetros relacionados con la activación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) que serán discutidas en el capítulo dedicado a esa enzima.

#### ***3.2.1.4. Comparación de las tres actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa***

En la campaña 2004/2005, los picos de glucosa no coinciden con los de actividad IA, reproduciendo el comportamiento observado para la variedad Ramona, empleada en campañas anteriores, lo que puede indicar similitudes entre la variedad Ramona y la variedad Dax empleada en nuestros ensayos.

Las remolachas en las condiciones T1 y T2 presentan tanto el perfil (máximo en julio y después desciende) como los valores dentro de lo observado para la variedad Ramona en condiciones de déficit hídrico en la campaña 2001/2002. Este pico de actividad en julio no se observa en las remolachas de la condición T3.

En las condiciones de T3 se presentan los valores más bajos para todas las actividades encargadas de la degradación de sacarosa, SS, IN, IA. Esto podría deberse a que este tratamiento de túnel ventilado permite mantener condiciones que favorecen la estabilidad de la sacarosa, no teniendo que usar las reservas de sacarosa de la raíz. La evolución de la actividad SS específica muestra un perfil constante de alta actividad durante los meses de abril y mayo para los tres tratamientos. Después, su actividad disminuye y aumenta la variabilidad. Los perfiles de la actividad IN específica, muestran que esta enzima va aumentando su actividad en estos meses de crecimiento y a partir de junio, oscila mucho más y vuelve a descender. Estas actividades enzimáticas parecen por tanto responder a dos momentos de desarrollo en los que las necesidades energéticas y estructurales varían: Un primer momento en los meses más suaves, abril y mayo donde la planta empieza la fase de acumulación de sacarosa en la raíz, y un segundo momento en junio y julio donde se cortan los riegos y la planta sufre mayor estrés.

También se puede observar que los picos de actividad IN y SS observados para el 14 de junio en T1 y T2, se retrasan al 28 de junio en el caso de la actividad IA. Los máximos de actividad de enzimas degradativas de la sacarosa se producen el 14 de junio, coincidiendo con máximos de ADP (datos mostrados en capítulo 3.3, Fig. 3.1 B). Estos picos en las actividades enzimáticas y en el pool de ADP (parámetro discutido en el siguiente capítulo) podrían responder a una posible situación de estrés puntual.

En su conjunto, estos datos muestran que los tratamientos con los túneles en esta campaña, tal como muestran los datos climáticos, no generaron desequilibrios importantes en la temperatura, en realidad no se produjo el golpe de calor esperado con la colocación de los plásticos y además fue un año con un aparte de agua adecuado, esto se reflejó tanto en los niveles de glucosa como en los de las actividades enzimáticas, que muestran en general valores bajos respecto a campañas anteriores y pocas diferencias entre el control y el tratamientos. Sin embargo, esta escasa diferencia de temperatura generó diferencias significativas, aunque de escasa amplitud, en algunos muestreos en los parámetros metabólicos estudiados y correlaciones de interés como se muestra en el estudio de correlaciones, entre las actividades enzimáticas y los datos agronómicos y fisiológicos.

### 3.2.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña)

---

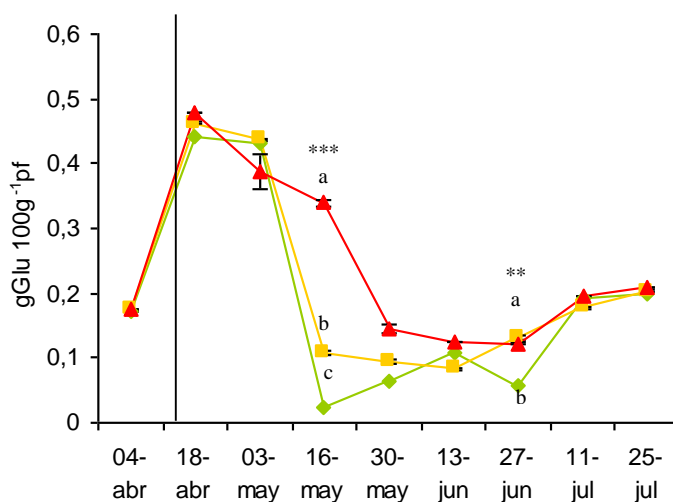
#### 3.2.2.1. Concentración de glucosa en la raíz en la 2ª campaña

En esta campaña las características climáticas de ese año y el diseño experimental de los tres túneles (T1 control; T2 abierto y T3 cerrado) permitieron general un verdadero golpe de calor en T3 en el que se registraron temperaturas de hasta 15 °C más altas que en el túnel control. El golpe de calor en T3 se produjo en fechas anteriores al 14 de abril, y el 14 de abril se decidió abrir el túnel para permitir su ventilación y para proceder a la normalización de la temperatura. Lo primero que se observó en esta campaña es una acumulación inusual de glucosa en los muestreos de principios de mayo, en las tres condiciones de ensayo (Fig. 2.4.), alcanzando valores de 0,5 g/100 gpf, mientras que los valores típicos de la época no superan los 0,1- 0,2 g/100 gpf. Estos valores son inusuales para la época del año, excepto para cultivos de secano (Jiménez 2004). En este sentido, esta campaña agrícola 2005 (siembra otoño 2004) se caracterizó por la ausencia de lluvias y por la presencia de heladas. Los efectos negativos sobre el cultivo de la remolacha fueron significativos, encontrándose una menor producción (capítulo 3.1, Fig. 1.10). Si bien las temperaturas tuvieron un comportamiento regular, paralelo a la media histórica, destacando un menor valor en los meses de noviembre y diciembre y un aumento en los meses de mayo y junio, sin embargo, la falta de lluvias, obligó a un adelanto de los riegos en los cultivos de regadío y originó importantes pérdidas de producción en el cultivo de secano (AIMCRA, 2006). Los altos niveles de glucosa detectados en abril y principios de mayo (Fig. 2.4) responde bien al hecho de que fue un año seco por lo que se pone en evidencia que una alta temperatura combinada con una restricción hídrica en estos momentos del cultivo hacen aumentar de forma drástica el contenido en glucosa y por ende de los azúcares reductores y provocar pérdidas de las cosechas. Hay que señalar que si bien se trata de cultivos de regadíos, estos resultados ponen de manifiesto que el agua aportada no fue suficiente y que el cultivo sufrió estrés hídrico debido a la escasez de lluvias. Por el contrario, los valores de glucosa encontrados en junio son muy bajos (0,1 g/100 gpf versus 0,5 a 2 g/100 gpf) y se corresponden con valores obtenidos para variedades poco productoras de azúcares reductores como la variedad Ramona. En este sentido, la variedad Dax utilizada en este estudio es una variedad parecida a Ramona. Se observan algunas diferencias entre los perfiles de glucosa del control y de los tratamientos (parcelas que han sufrido el golpe de calor) sobre todo en el muestreo del 16 de mayo. Este dato muestra que el tratamiento que recibió el golpe de calor más fuerte (T3) mantuvo durante más tiempo niveles de glucosas significativamente más altos que los tratamientos con menor temperatura, confirmando que la combinación de alta temperatura con una restricción hídrica y en esas etapas del crecimiento del cultivo es una combinación que desencadena la acumulación de glucosa.

Colectivamente estos resultados indican que los valores de glucosa detectados en este ensayo en los meses de abril y principios de mayo son muy altos (3 a 4 veces más) respecto de los



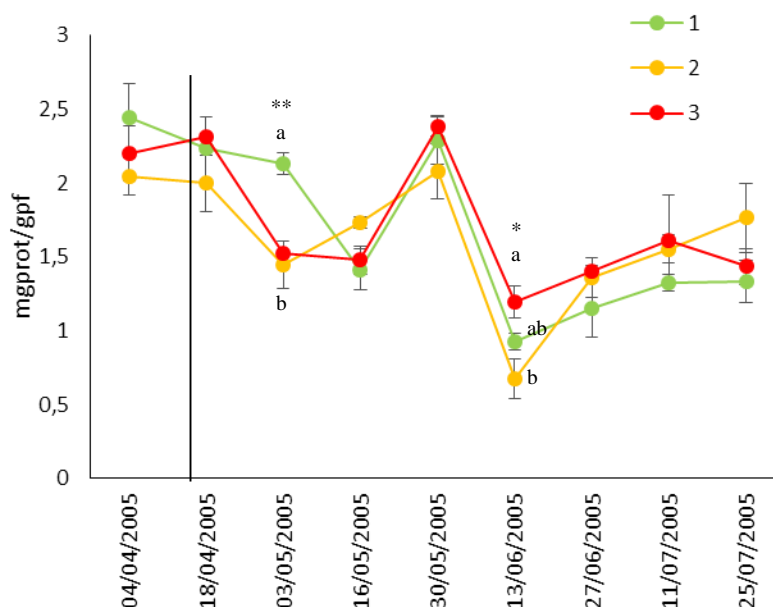
encontrados en años anteriores para otras cosechas estudiadas y para nuestra cosecha anterior del 2004-2005 (Fig. 2.2). También se observa que el golpe de calor provocado en el túnel T3, acentúa una situación de estrés que se da en los tres tratamientos. Tras la pérdida de hojas que se produce en el 3<sup>er</sup> muestro de T3 (Fig. 1.10 C; capítulo 3.1) se hace evidente las diferencias en el contenido de glucosa, diferencias que, aunque amortiguadas, se mantienen hasta finales de julio con un máximo en el muestreo del 16 de mayo. Estos resultados también muestran que un golpe de calor con restricción hídrica en etapas en que la remolacha aún se está desarrollando (marzo, abril), tiene una importante repercusión en la caída de las hojas como pasó en T3 y una importante disminución de sacarosa en la raíz. Como consecuencia de esta movilización de reservas y de la degradación de sacarosa, se acumula glucosa.



**Figura 2.4.** Evolución de la concentración de glucosa a lo largo de los muestreos. T1 (-♦-) muestra las condiciones control, T2, (-■-) túnel completo; T3 (-▲-) túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , diferencias entre tratamientos explicadas en el texto. La línea indica el momento en que se procedió a abrir el túnel 3, después de sufrir el golpe de calor.

### 3.2.2.2. Cantidad de proteína en la raíz

La cantidad de proteína sigue un perfil descendente en los primeros cuatro muestreos (Fig. 2.5), hasta el 18 de mayo, fecha en la que sube a niveles de abril en las tres condiciones. Luego desciende para ir aumentando en los tres últimos muestreos como se ha observado en anteriores campañas. Los niveles máximos de proteína son ligeramente superiores a los de la campaña anterior llegando hasta 2,5 mg/gpf frente a los 2 mg/gpf alcanzados en el 2004 como máximo. Hay poca diferencia entre los tratamientos, excepto para el muestreo del 3 de mayo, 3<sup>er</sup> muestreo, donde se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el control, con valores más altos y los tratamientos bajo el túnel, con valores más bajos. También hay diferencia estadísticamente significativa en el 6<sup>o</sup> muestreo, antes de la subida final.



**Figura 2.5.** Cantidad de proteína obtenida durante la segunda campaña. T1 (-♦-) muestra las condiciones control, T2, (-■-) Túnel completo T3 (-▲-) el túnel con ventilación. La línea indica el momento en que se procedió a abrir el túnel 3, después de sufrir el golpe de calor. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

### 3.2.2.3. Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la segunda campaña (2004-2005)

En esta campaña se produjo un golpe de calor significativo acompañado de escasas lluvias y subidas anormales de la cantidad de glucosa en abril y principios de mayo (Fig. 2.4), por lo que en este apartado analizaremos la evolución de las actividades enzimáticas implicadas en la hidrólisis de la sacarosa. De las enzimas analizadas en la raíz de remolacha es la SS la que presenta mayor actividad en todos los tratamientos para el periodo muestreado, llegando a máximos de 1,5 U/mg prot (Fig. 2.6 B). Le sigue la IN (0,06 U/mg prot; Fig. 2.6 D), y la que menor actividad presenta es la IA (0,03U/mg prot) (Fig.2.6 F). Esta es la distribución general encontrada también en estudios anteriores (Jiménez 2004) para estas actividades. En los gráficos de la figura 2.6 (pg. 127) se muestra la evolución de estas actividades enzimáticas, totales y específicas, en los diferentes tratamientos a lo largo del periodo de estudio.

#### 3.2.2.3.1. Evolución de la actividad Sacarosa Sintasa (SS)

Cabe destacar el perfil que presenta la sacarosa sintasa. En la evolución de la **actividad específica** se encuentra que los tratamientos siguen el mismo perfil que el control, con dos picos de actividad en el 4 de mayo y en el 18 de junio. Analizando la diferencia de actividad entre T3 y el

control (Fig. 2.6. B) se observa que a partir del 3<sup>er</sup> muestreo, esta actividad es más alta en el T3, volviendo a recuperar valores cercanos al control en los dos últimos muestreos. Se observa una diferencia significativa entre los valores del control y T3 en el muestreo 5<sup>o</sup> (31 de mayo).

La evolución de la **actividad total** (U/gpf) también sigue un patrón similar en los tres tratamientos, con mayor actividad durante los meses de mayo y una caída de la actividad en el periodo final del cultivo (Fig. 2.6 A). En concreto, en los tres primeros muestreos la actividad aumenta, tanto en el control como en los tratamientos y a partir de aquí se separan, manteniéndose más alta en T3 durante los muestreos de junio y principios de julio. Este pico de actividad total queda bien reflejado como diferencia de la actividad T3-T1 (Fig. 2.7 A y B). Es muy importante destacar que se observan diferencias con significado estadístico entre los tratamientos en todos los muestreos excepto en el primero. Esto indica que durante esta campaña el túnel sí modificó las condiciones metabólicas de la raíz. El perfil de actividad total de T3 (Fig. 2.6 A) muestra valores superiores al control a partir del 4<sup>o</sup> muestreo siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En ese sentido coincide con la evolución de la glucosa que comienza a mostrar valores de acumulación de sacarosa superiores al control también a partir del 4<sup>o</sup> muestreo. Los estudios de correlaciones estadísticas presentados a continuación muestran una correlación positiva entre los valores de glucosa (Fig. 2.4) y los valores de actividad SS de 0,548 con una significación menor del 0,001. En conclusión los resultados expuestos permiten subrayar la participación de la SS en la producción de glucosa como respuesta de las plantas a los golpes de calor combinados con déficit hídrico cuando estos se producen en etapas jóvenes (abril) del cultivo. La figura 2.7 representa las diferencias de actividad SS entre T3 y el control y pone de manifiesto que los valores de esta enzima se mantuvieron por encima de los del control en casi todo el periodo central (mayo a julio) del desarrollo del cultivo.

#### 3.2.2.3.2. Correlaciones de la actividad SS durante la segunda campaña (2004-2005)

En esta segunda campaña existe menor número de correlaciones de la actividad SS con los parámetros climáticos y agronómicos. Para el estudio de las correlaciones de la actividad SS y el resto de las enzimas, se han incluido también los datos de otros ensayos (ensayo hídrico y de microtúneles) que se presentarán en capítulos posteriores.

En la tabla 2.3 se muestran las correlaciones encontradas. En cuanto a los parámetros climáticos y agronómicos, la **actividad sacarosa sintasa disminuye** cuando:

- Aumenta la temperatura mínima (filas 1).
- Aumentan los grados día (desarrollo del cultivo) o la evapotranspiración (ET<sub>o</sub>; filas 2-6).
- Aumenta la producción de raíz y de planta en peso total o materia seca y la cantidad de sacarosa (filas 7-11).
- Disminuye la producción de alfa aminos, el contenido en K (filas 12-13).

En esta segunda campaña no se han encontrado correlaciones significativas con la humedad relativa, el brix de la raíz o el contenido en nitrógeno total como en la campaña anterior. Si aparece la correlación positiva con el nitrógeno en forma de aminoácidos.

Durante esta segunda campaña aparece de nuevo una correlación positiva con el contenido en glucosa de la raíz como en la primera campaña (fila 14) pero no aparece una correlación suficientemente significativa con la actividad IN.

**Tabla 2.3.** Correlaciones entre la actividad SS total y específica y los parámetros climáticos y agronómicos durante la segunda campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>.

	Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
1	T min	SS-U/gpf	-0,594**	27
2	GDIA	SS-U/gpf	-0,701****	27
3	GDIA6d	SS-U/gpf	-0,562**	27
4	GDIA4d	SS-U/gpf	-0,500**	27
5	EToC6d	SS-U/gpf	-0,521**	27
6	EToC4d	SS-U/gpf	-0,514**	27
7	Prod MSRaíz	SS-U/gpf	-0,717****	28
8	Prod MSPlanta	SS-U/gpf	-0,711****	28
8	Prod Raiz	SS-U/gpf	-0,671****	30
10	Azúcar/Ha	SS-U/gpf	-0,658***	25
11	Prod Planta	SS-U/gpf	-0,593***	30
12	AAmino	SS-U/gpf	0,540**	26
13	Potasio	SS-U/gpf	0,656***	26
14	SS-U/gpf	Glucosa- Ugpf	0,548***	33

### 3.2.2.3.3. Evolución de la actividad Invertasa Neutra (IN)

La actividad invertasa neutra evoluciona de forma irregular tanto en el control como en los tratamientos. En la actividad **IN total** se aprecia un perfil similar al del año anterior, descendente hasta los muestreos de julio y con un repunte tras la finalización de los riegos. Pero en esta 2ª campaña de 2004/2005 se observa que los valores de los primeros muestreos son un 40% más altos que en la campaña anterior. La comparación entre tratamientos muestra diferencias estadísticamente significativas entre T1, T2 y T3 en los muestreos 2º (18 de abril) y 4º (16 de mayo) observando la actividad total. Esta diferencia estadística sólo se mantiene en el muestreo del 18 de abril para la **actividad específica**. En la gráfica de actividad específica de la IN (Fig. 2.6 D) puede observarse un

perfil irregular. La diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos observada en el 2º muestreo coincide con el muestreo tras la apertura del túnel, situación que pudo generar el aumento de la actividad IN observada en T3 y T2.

#### 3.2.2.3.4. Correlaciones de la actividad IN durante la segunda campaña (2004-2005)

Durante la segunda campaña, a nivel de enzimas, la actividad IN sólo se correlaciona con parámetros relacionados con la fosforilación de la PEPC que será discutido en el capítulo dedicado a esta enzima (capítulo 3.5).

Las correlaciones en los parámetros agronómicos y climáticos se muestran en la tabla 2.4. Puede deducirse que la **actividad invertasa neutra aumenta** cuando:

- El cultivo está en etapas tempranas (filas 1-3, correlación con la integral térmica).
- Hay menor déficit hídrico en la planta (filas 4, 5, 6).
- Hay menor cantidad de sacarosa por Ha y menor polarización (filas 7 y 8).
- Hay más potasio en la raíz (fila 9).

Durante esta segunda campaña, la actividad invertasa neutra parece estar asociada a los momentos de crecimiento y menor estrés del cultivo.

**Tabla 2.4.** Correlaciones entre la actividad IN total y los parámetros climáticos y agronómicos durante la segunda campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001; (\*\*\*\*) sign. <0,0001.

Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
<b>1 GDIA</b>	<b>IN- U/gpf</b>	<b>-0,680****</b>	<b>27</b>
2 GDIA6d	IN- U/gpf	-0,547**	27
3 GDIA4d	IN- U/gpf	-0,540**	27
4 BRIX	IN- U/gpf	-0,523**	31
5 %MS Raíz	IN- U/gpf	-0,513**	29
6 %MS Planta	IN- U/gpf	-0,511**	29
7 Polarización	IN- U/gpf	-0,631***	26
8 Azúcar/Ha	IN- U/gpf	-0,580**	25
9 Potasio	IN- U/gpf	0,535**	26

#### 3.2.2.3.5. Evolución de la actividad Invertasa Ácida (IA)

La actividad invertasa ácida presenta, como en la campaña anterior, la menor actividad de todas las ensayadas y la mayor variabilidad. Estadísticamente no hay diferencia significativa entre

los tres tratamientos ni en actividad total ni específica, debido a la gran dispersión de los datos. En esta campaña de 2005 esta enzima alcanza valores más altos que los observados en campañas anteriores independientemente del tratamiento seguido. Los niveles de actividad mostrados en Julio son bajos (alrededor de 0,03 U/mg prot), y son valores similares a los mostrados por otras variedades que acumulan pocos azúcares reductores como la variedad Ramona, variedad en la que no se observan picos de actividad IA coincidentes con el fin de los riegos (Jiménez 2004). En ese sentido, trabajos anteriores realizados por nuestro grupo indican que los valores de actividad IA alcanzados por variedades como Claudia al finalizar los riegos (mes de julio) alcanzan valores de actividad IA de hasta 0,1 U/mg prot.

Los resultado de la figura 2.6 E y F, relativos a la actividad IA, muestran diferencia entre el T3 y el control, en cuanto a la distribución de los picos alcanzados. En T3 se observa un pico de actividad en el muestro 3 (4 de mayo), coincidiendo con la caída masiva de las hojas (Fig. 1.10 C y D, en capítulo 3.1). Esta enzima, que parece activarse en situaciones de estrés, podría responder en primera instancia a las necesidades de movilización de carbohidratos desde la raíz. En la raíz de la remolacha azucarera se ha propuesto que las invertasas ácidas son responsables de la hidrólisis de la sacarosa para atender a las demandas de la respiración y que la actividad IA vacuolar se incrementa en respuesta al estrés o a los rebrotes (Berghall et al. 1997). También se ha descrito que la IA vacuolar estaría ligada a la movilización de reserva almacenada en la vacuola (Sampietro et al. 1980). El pico observado en T3, en el tercer muestreo estaría indicando la activación para responder en primera instancia a las necesidades de movilización de carbohidratos desde la raíz, para compensar la pérdida de fotosintatos procedentes de las hojas y para el rebrote de nuevas hojas. Por el contrario el pico de actividad en el control se localiza en el muestro del 3 de julio, coincidiendo con la finalización de los riegos.

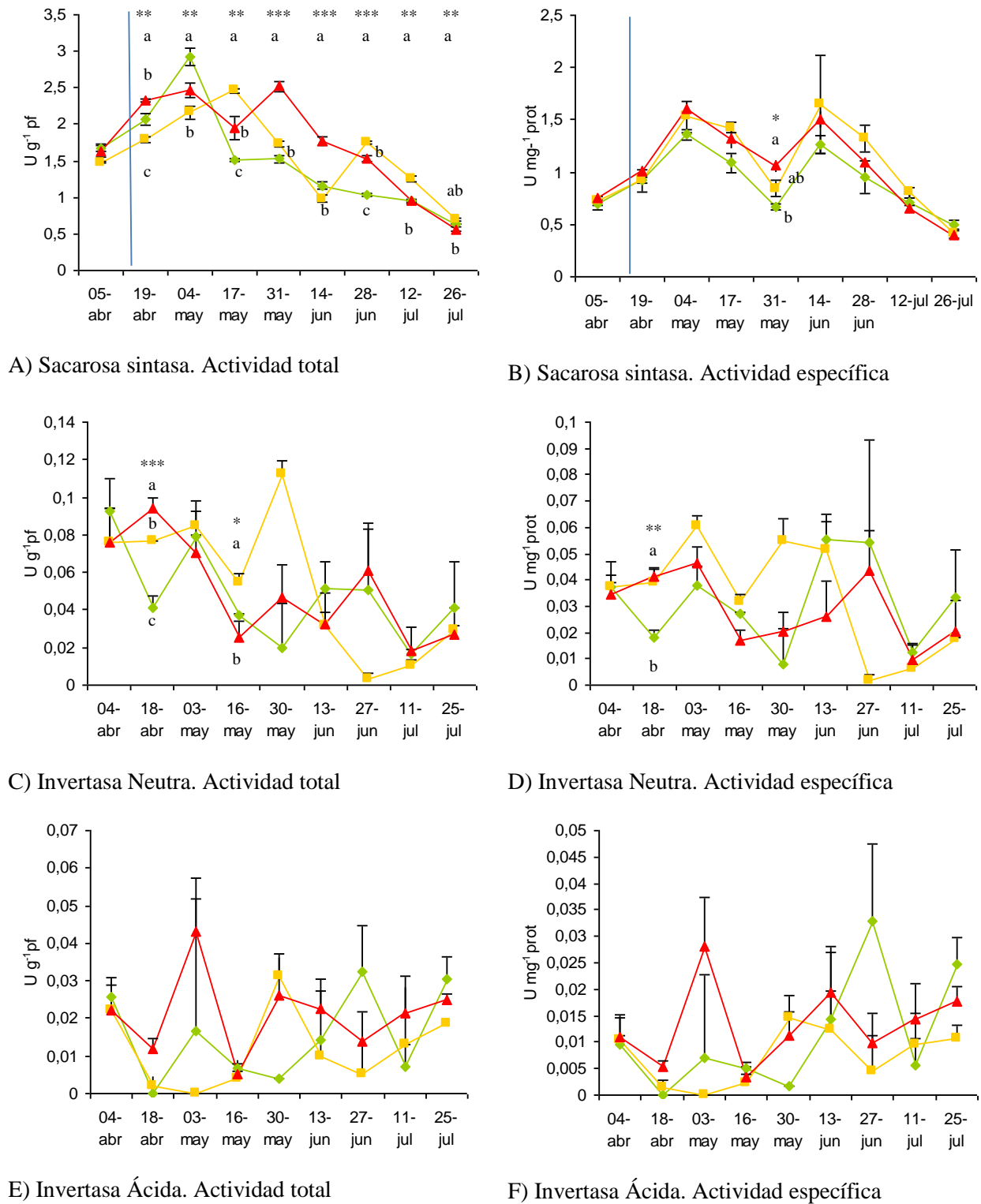
En esta segunda campaña, la actividad IA no muestra correlaciones con el resto de parámetros estudiados que presenten coeficientes de Pearson  $|r| > 0,5$  y con significación  $< 0,05$ .

#### ***3.2.2.4. Comparación de las tres actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa durante la segunda campaña (2004-2005)***

Del análisis conjunto de los resultados de las actividades enzimáticas podemos concluir que el T3 mostró mayor actividad sacarosa sintasa (incrementos máximos de 0,4 U/mg prot.) durante todo el periodo en que se registraron Tª superiores al control, es decir a partir de abril y hasta mediados de junio donde las temperaturas del control y T3 empiezan a equipararse (Fig. 2.6)). En ese sentido, en el T2 también se aprecia la misma respuesta, sobre todo cuando la actividad se expresa como actividad específica (U/mg prot.; Fig. 2.6.B). En los órganos sumideros SS tiene importantes

funciones, soporta el crecimiento de las estructuras de almacén proveyendo de sustratos para la respiración (Xu et al. 1989) y biosíntesis de la pared celular (Amor et al. 1995). SS podría estar incrementando su actividad en la medida en que se recupera la parte autótrofa para desviar cantidades crecientes de fotoasimilados hacia el órgano sumidero y utilizar dichos fotosintatos en el crecimiento de la raíz, después del estancamiento por el golpe de calor.

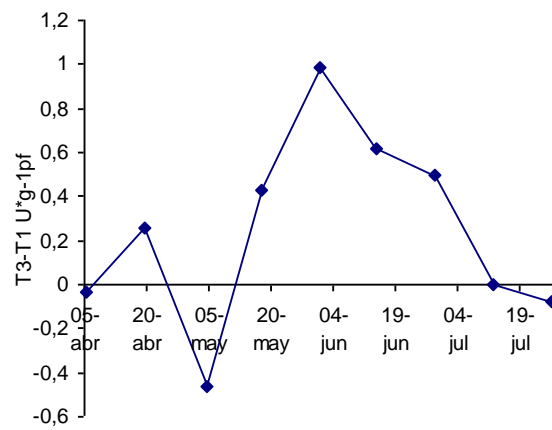
Respecto de las actividades invertasas se aprecia una diferencia entre la distribución de picos de actividad IA, mostrando T3 un pico el 4 de mayo, coincidiendo con la prácticamente desaparición de la parte aérea de la planta (Fig. 1.10 C, capítulo 3.1), mientras que el control muestra un pico de actividad el 3 de julio, coincidiendo con la finalización de los riegos. En la actividad IN las repercusiones del golpe de calor son difíciles de analizar aunque cabe destacar que las diferencias significativas encontradas entre control y tratamientos son justo tras la apertura del túnel, en el muestreo dos, coincidiendo con el principio de las diferencias estadísticamente significativas encontradas en la actividad SS total.



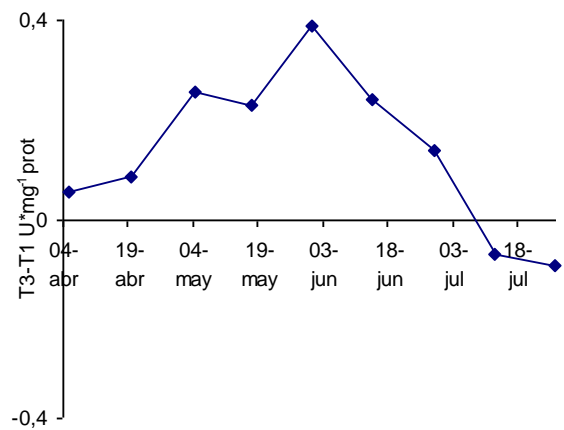
**Figura 2.6.** Evolución a lo largo de los muestreos de las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa durante la segunda campaña. A) SS total; B) SS específica; C) IN Total; D) IN específica; E) IA total; F) IA específica. T1 (◆) muestra las condiciones control; T2 (■) túnel completo; T3 (▲) túnel con ventilación. La línea muestra la fecha de apertura del túnel. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



A) T3-T1 Actividad Total SS



B) T3-T1 Actividad Específica SS



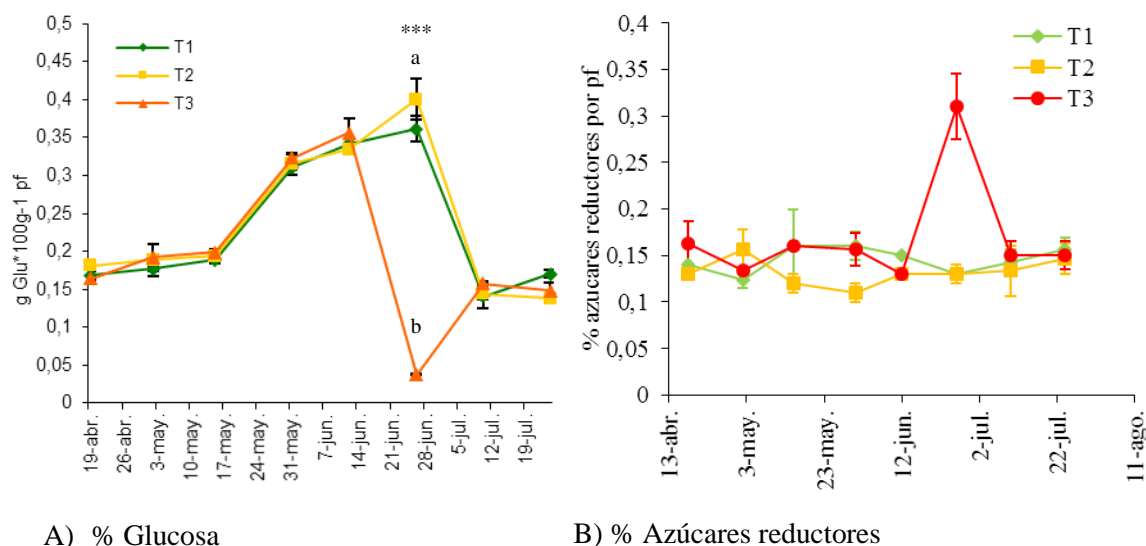
**Figura 2.7.** Evolución de los incrementos en la actividad SS de T3 respecto al control (T3-control) a lo largo de los muestreos. A) Diferencias en la actividad total; B) Diferencias en la actividad específica.

### **3.2.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña)**

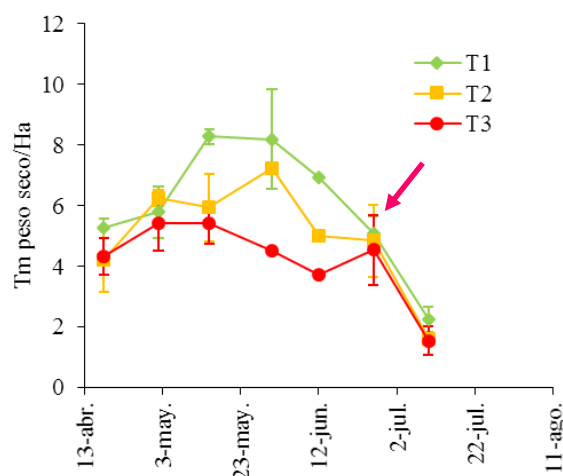
---

#### **3.2.3.1. Concentración de glucosa en la raíz**

Esta tercera campaña se pareció climáticamente a la primera en que el aporte por agua de lluvia fue significativo, sin embargo se registraron en general, temperaturas superiores a la primera campaña y similares a la segunda (ver datos climáticos en capítulo 3.1). Los resultados muestran que el contenido en glucosa de la raíz presenta valores altos respecto a la primera campaña pero similares a los de la segunda. Sin embargo la distribución de los picos de acumulación de glucosa son diferentes a los de la campaña anterior. En esta campaña los valores de glucosa empiezan a elevarse a principios de junio, mientras que en la campaña anterior los mayores valores de glucosa se registraron en abril, y en la primera campaña no se produjeron (Fig. 2.8). En los dos últimos muestreos, la concentración de glucosa alcanza valores ligeramente más bajos en esta campaña que en la 2ª (0,16% frente a 0,20%). En cuanto a los valores de glucosa entre los tratamientos, hay que destacar que los tres perfiles son sorprendentemente similares excepto en el 6º muestreo, donde la glucosa alcanza su máximo valor para T1 y T2 y desciende bruscamente en las raíces de T3, coincidiendo con los máximos valores de azúcares reductores en T3 (Fig. 2.8 B). Esta discrepancia entre los valores de azúcares reductores (glucosa + fructosa) y los valores de glucosa ponen de manifiesto una posible acumulación de fructosa en el pico del 27 de junio. Esta acumulación de fructosa puede ser una consecuencia del crecimiento de la raíz ya que la glucosa y no la fructosa es la que se emplea en producir nuevos materiales para la pared celular. Este pico de acumulación de fructosa y disminución de glucosa coincide con un aumento de la producción foliar en peso seco (Fig. 2.10) y en LAI (Fig. 1.16 D) tras el mínimo medido para T3, y un fuerte aumento de la producción de raíz y de la polarización (Fig. 1.16 A, E). Este conjunto de datos indica que las plantas de la condición T3 se habían recuperado tras el choque térmico. La caída de glucosa y el aumento de la polarización y los azúcares reductores, indicarían la recuperación del aparato fotosintético (aunque leve) lo que permitió el aumento de la capacidad sumidero de la raíz.



**Figura 2.8.** Evolución de la concentración de glucosa y de los azúcares reductores a lo largo de los muestreos de la 3ª campaña. T1 (—♦—) muestra las condiciones control; T2 (—■—) túnel completo; T3 (—▲—) túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

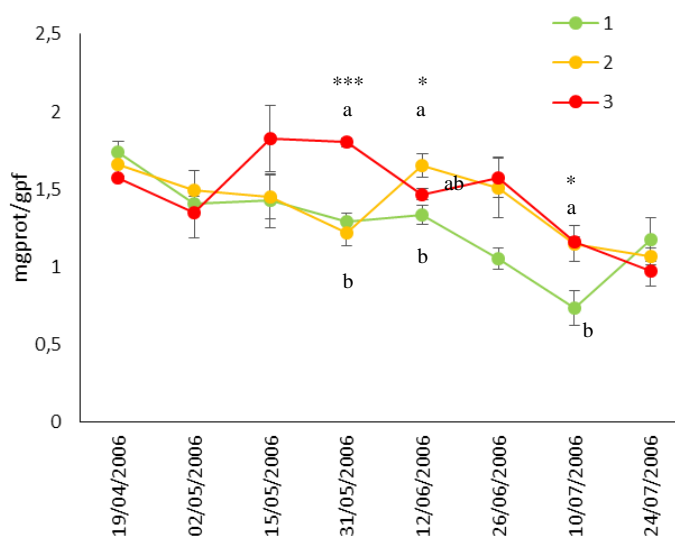


**Figura 2.9.** Evolución de la producción foliar en peso seco a lo largo de los muestreos. La flecha muestra el incremento que se produce en el 6º muestreo del 27 de junio. T1 (—♦—) muestra las condiciones control; T2 (—■—) túnel completo; T3 (—▲—) túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE.

### 3.2.3.2. Cantidad de proteína en la raíz

Los valores de cantidad de proteína se mantienen próximos a los detectados en la 2ª campaña (Fig. 2.10). Al igual que esta, no se detecta la bajada de la cantidad de proteínas que se detectó en la primera campaña en los muestreos 5, 6 y 7 del mes de junio. Tampoco se observó el aumento cercano a la recolección que se detectó en la primera campaña. En cuanto a los distintos tratamientos cabe destacar que T3 presenta valores superiores al control prácticamente en todos los muestreos. Esta

diferencia es estadísticamente significativa en el muestreo 4º, 5º y 7º. T2 mantiene un comportamiento idéntico al control en los primeros 4 muestreos y a partir del 5º sigue el comportamiento de T3.



**Figura 2.10** Cantidad de proteína obtenida durante la tercera campaña. T1 (—●—) muestra las condiciones control; T2 (—●—) túnel completo; T3 (—●—) túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

### 3.2.3.3. Evolución de las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa: Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Ácida (IA) durante la tercera campaña (2005-2006)

#### 3.2.3.3.1. Evolución de la actividad SS

La actividad SS en esta campaña muestra en general valores en torno a los observados en las otras dos campañas tanto para la actividad total como para la **actividad específica** (Fig. 2.11 A, B). Sin embargo en esta 3ª campaña los valores parecen más homogéneos a lo largo de todo el periodo de muestreo y no se observan picos de actividad como ocurre en la segunda campaña y en la actividad específica de la primera campaña. Es importante destacar que en el análisis de los distintos tratamientos los valores del control (T1) permanecen por encima de los valores de T3, mostrando diferencias estadísticamente significativas en el 2º (2 de mayo) y 4º (31 de mayo) muestreos en actividad total y específica. Esta situación se invierte y en los últimos muestreos: T3 supera los valores del control con diferencia significativa para ambas actividades en el último muestreo (24 de julio). En la campaña anterior el control presentaba prácticamente en todos los muestreos valores significativamente inferiores que T3.

### 3.2.3.3.2. Correlaciones de la actividad SS durante la tercera campaña (2005-2006)

En cuanto a las correlaciones de la SS durante la tercera campaña (Tabla 2.5), cabe destacar que durante esta tercera campaña se recupera la correlación con la actividad IN y no hay relación con el contenido en glucosa de la raíz. En general, para el estudio de las correlaciones de la actividad SS se han incluido también los datos de otros ensayos (ensayo hídrico y de microtúneles) que se presentarán en capítulos posteriores.

**Tabla 2.5.** Correlaciones positivas entre la actividad SS total y específica y el resto de actividades enzimáticas de degradación de sacarosa y parámetros metabólicos, durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001.

Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
SS-U/gpf	InvNeutra- U/mgprot	0,571***	32
SS-U/gpf	InvNeutra- U/gpf	0,571***	32

En esta tercera campaña, también se encuentran correlaciones entre la actividad SS y los parámetros agronómicos y climáticos que se muestran en la tabla 2.6. Se muestran comportamientos similares a los de las campañas anteriores. En este sentido, la actividad **sacarosa sintasa disminuye** con:

- el aumento de temperatura (mínima y media; filas 1,2),
- el aumento del desarrollo del cultivo (GD; filas 3-6) y el porcentaje de materia seca de limbos (línea 7).
- La disminución de la cantidad de hojas (cobertura, LAI, producción de hojas, etc; filas 8-13)

Durante esta tercera campaña no aparecen correlaciones significativas con la producción de raíz ni la cantidad de nitrógeno medido en la planta.

**Tabla 2.6.** Correlaciones entre la actividad SS total y específica y los parámetros climáticos y agronómicos durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001; (\*\*\*\*) sign. <0,0001.

	Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
1	T min	SS-U/gpf	-0,512*	24
2	T media	SS-U/gpf	-0,505*	24
3	GDIA4d	SS-U/gpf	-0,702***	24
4	GDIA6d	SS-U/gpf	-0,678***	24
5	GDIA2d	SS-U/gpf	-0,638***	24

6	GDIA	SS-U/gpf	-0,560**	24
7	%MSL	SS-U/gpf	-0,535**	29
8	CobEstLAI	SS-U/gpf	0,538**	22
9	Prod MSHoja	SS-U/mgprot	0,540**	29
10	Hojas/Planta	SS-U/gpf	0,541**	32
11	LAI	SS-U/gpf	0,582**	22
12	Prod Hojas	SS-U/gpf	0,650****	32
13	Prod MSHojas	SS-U/gpf	0,708****	29

### 3.2.3.3.3. Evolución de la actividad invertasa neutra

La actividad IN muestra oscilaciones como en campañas anteriores (Fig. 2.11 C y D). Los tres tratamientos presenta valores mínimos en el 7º muestreo tanto en **total** como en **específica** (10 de julio) con subidas en el último muestreo (24 de julio). Este patrón de bajada de la actividad en el penúltimo muestreo con una subida en el último muestreo se repite en las tres campañas estudiadas. La actividad IN alcanza en 2006 valores en un intervalo similar al de la segunda campaña y mayores que en la primera en actividad total y también en actividad específica. Es en el 4º muestreo (31 de mayo) para el T3, donde se alcanza el valor máximo de esta actividad, pero también presenta gran variabilidad, por lo que no es estadísticamente significativo. Precisamente en este 4º muestreo se dan interesantes condiciones para T3 descritas anteriormente (caída de la glucosa, aumento de azúcares reductores, leve aumento de la producción de hojas y gran aumento de la polarización y la producción de raíz). Este máximo de IN indica que esta enzima estaría participando en este proceso de crecimiento, estimulando la condición de sumidero de la raíz.

### 3.2.3.3.4. Correlaciones de la actividad IN durante la tercera campaña (2005-2006)

En la tabla 2.7 se muestran las correlaciones importantes de la actividad IN y los parámetros agronómicos y climáticos. El análisis de estos datos permite interpretar que durante esta tercera campaña la **actividad invertasa neutra aumenta** cuando:

- El cultivo está en etapas tempranas (correlación inversa con la integral térmica, fila 1-6).
- Hay menor déficit hídrico en la raíz y en la hoja (correlación inversa con los contenidos en materia seca, filas 7-10).
- Hay mayor cantidad de nitrógeno en la planta (correlación directa con el nitrógeno total y la cantidad de proteínas, filas 11-13).
- Aumenta la actividad sacarosa sintasa (correlación positiva con la actividad total SS, filas 14,15).

**Tabla 2.7.** Correlaciones entre la actividad IN total y específica y los parámetros climáticos y agronómicos durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001.

	Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
1	GDIA6d	IN- U/mgprot	-0,583**	24
2	GDIA6d	IN- U/gpf	-0,583**	24
3	GDIA4d	IN- U/mgprot	-0,568**	24
4	GDIA4d	IN- U/gpf	-0,568**	24
5	GDIA2d	IN- U/mgprot	-0,509*	24
6	GDIA2d	IN- U/gpf	-0,509*	24
7	PORMSL	IN- U/mgprot	-0,561**	29
8	PORMSL	IN- U/gpf	-0,561**	29
9	PORMSR	IN- U/mgprot	-0,501**	29
10	PORMSR	IN- U/gpf	-0,501**	29
11	NTR	IN- U/mgprot	0,733*	8
12	NTR	IN- U/gpf	0,733*	8
13	Proteína- U/gpf	IN- U/gpf	0,588***	32
14	SS- U/gpf	IN- U/mgprot	0,571***	32
15	SS- U/gpf	IN- U/gpf	0,571***	32

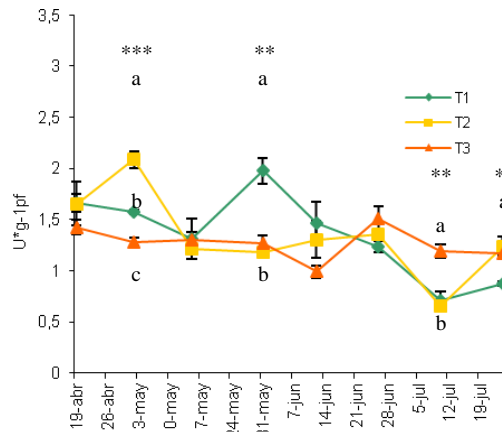
Durante esta tercera campaña, la actividad invertasa neutra parece estar asociada a los momentos de crecimiento vegetativo de las plantas, a situaciones de menor estrés hídrico del cultivo y de mayor cantidad de nitrógeno.

Durante la segunda y la tercera campaña la actividad IN se asocia a los parámetros que también se correlacionan con la actividad SS. La segunda y la tercera campaña estuvieron marcadas por un mayor estrés hídrico sobre las plantas. En estas condiciones más estresantes, la IN podría complementar la actividad SS, que muestra ser más sensible a las condiciones climáticas.

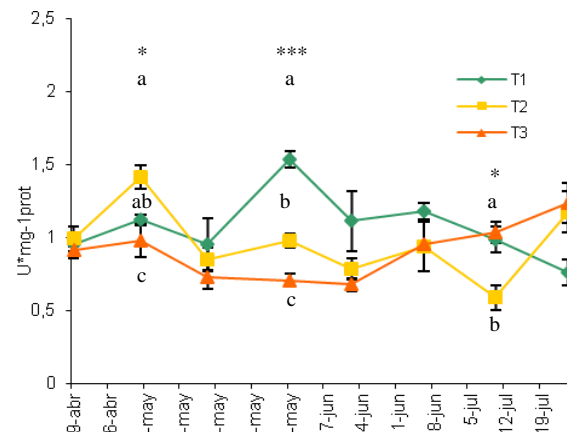
### 3.2.3.3.5. Evolución de la actividad invertasa ácida

La actividad IA también muestra un pico de actividad total y específica además de gran variabilidad en el 4º muestreo (Fig. 2.11 E y F). Ambos máximos coinciden con la caída de producción foliar. Estos picos podrían estar relacionados con la degradación de reservas para compensar la falta de producción de fotosintatos debido a la caída de las hojas.

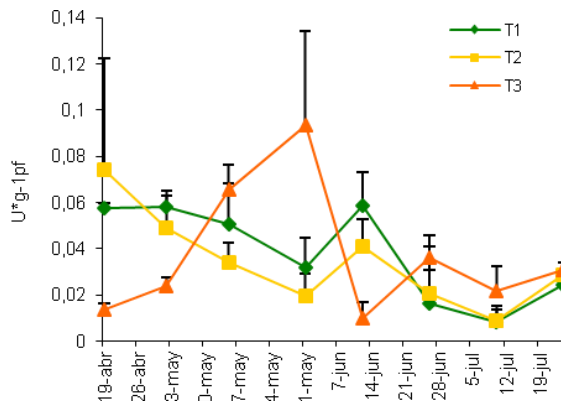
En esta tercera campaña, la actividad IA no muestra correlaciones con el resto de parámetros estudiados que presenten coeficientes de Pearson  $|r| > |0,5|$  y con significación <0,05.



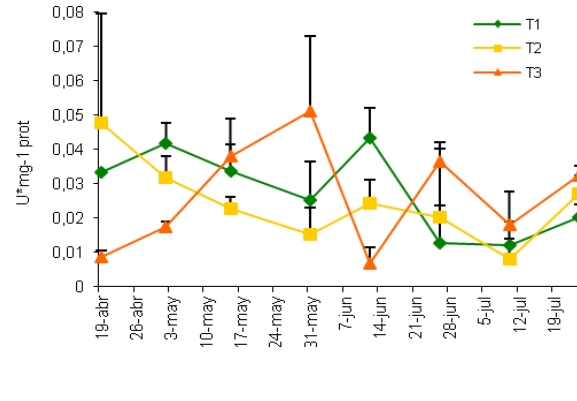
A) Sacarosa Sintasa. Actividad total



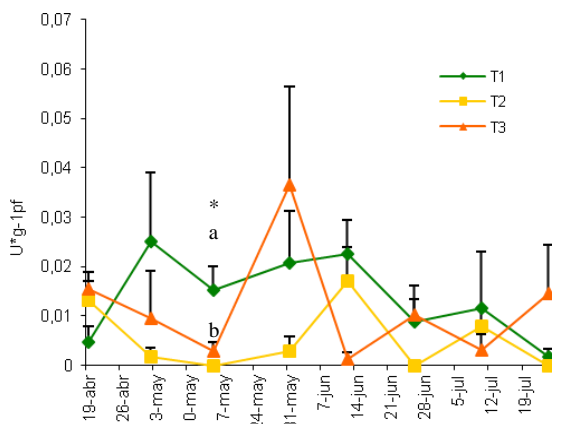
B) Sacarosa Sintasa Actividad específica.



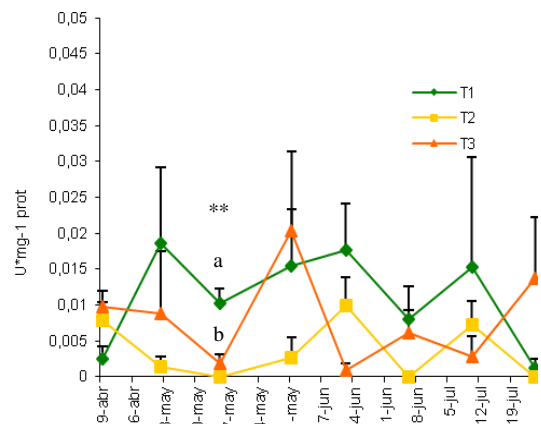
C) Invertasa Neutra. Actividad Total



D) Invertasa Neutra. Actividad Específica



E) Invertasa Ácida. Actividad total



F) Invertasa Ácida. Actividad Específica.

**Figura 2.11.** Evolución a lo largo de los muestreos de las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa en la 3ª campaña. A) SS total; B) SS específica; C) IN Total; D) IN específica; E) IA total; F) IA específica. T1 (—◆—) muestra las condiciones control; T2 (—■—) túnel completo; T3 (—▲—) túnel con ventilación. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*) $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



### 3.2.4. Patrones y evolución de las actividades de degradación de la sacarosa en las tres campañas estudiadas

---

En este apartado se analizan los diferentes aspectos estudiados (patrones de evolución por campaña en el experimento de túneles, diferencias estadísticas entre tratamientos, correlaciones por campaña) junto con las correlaciones globales por campaña encontradas. Esto permitirá dilucidar patrones de funcionamiento y respuesta de estas actividades enzimáticas de la degradación de la sacarosa así como condiciones específicas de cada campaña que pudieran estar influyendo en su funcionamiento.

En primer lugar, los perfiles de evolución de las enzimas indican que es la SS la enzima con valores más estables, es decir con menor dispersión en cada muestreo a lo largo del cultivo lo que indica una mayor estabilidad de la enzima. Además el perfil de actividad total suele ser descendente a partir del 3 o 4 muestreo. También es de las tres actividades enzimáticas estudiadas en este capítulo, la que presenta una **mayor respuesta al choque térmico** ya que es la que mayores diferencias presenta entre tratamientos en las tres campañas. Esto queda reflejado en las gráficas de evolución de la actividad enzimática mostradas y en la tabla 2.8 donde se ha resumido la información del número de las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (T1, T2, T3) por campaña.

La IN tiene en general perfiles muy similares a lo largo de las tres campañas como muestran las gráficas de evolución de actividad. Desciende a lo largo de los muestreos y repunta tras el cese de los riegos. Para esta enzima, es en la segunda campaña donde aparece un mayor impacto inducido por el golpe de calor (es donde existen más diferencias entre tratamientos). En la tercera campaña no hubo diferencia entre los tratamientos para esta actividad. Esto junto con las correlaciones encontradas en la 2ª y 3ª campaña, apunta a que esta actividad estaría relacionada con el **crecimiento** de los distintos órganos de la planta, bien por el desarrollo fenológico o de rebrotes tras situaciones de estrés.

La actividad IA no presenta diferencia entre los tratamientos en ninguna de las campañas, por su gran dispersión de los valores de cada muestreo, lo que parece indicar que tiene un patrón de respuesta rápido a **demandas puntuales de movilización de reservas**.

La evolución de la glucosa presenta un perfil en la primera campaña con cantidades muy bajas. En la segunda campaña la cantidad de glucosa sube mucho en los tres tratamientos pero T3 se diferencia del resto en el momento en que se produce la pérdida foliar continuando más alta hasta

que se igualan las coberturas entre los tratamientos. En la tercera campaña se retrasa la subida de la glucosa. En la primera y la segunda campaña el túnel produjo efectos en dos muestreos y en la tercera sólo en un muestreo pero con una diferencia muy importante.

En el capítulo anterior se mostró la diferencia en la duración y la amplitud de los golpes de calor producido por los túneles así como su influencia en los parámetros agronómicos. En cuanto a esto, la primera campaña mostró escasa diferencia entre los tratamientos pero la segunda y la tercera si mostraron diferencias importantes. Durante la segunda campaña además se sumó un efecto de déficit hídrico al golpe de calor producido por los túneles.

Aunque esto haría esperar que no hubiese diferencias entre tratamientos en la primera campaña, como se muestra en la tabla 2.8, este pequeño aumento de temperaturas si produjo variaciones en las actividades enzimáticas y los metabolitos estudiados.

**Tabla 2.8.** Resumen del número de muestreo por campaña que presentan diferencias estadísticamente significativas para cada uno de los parámetros estudiados en este capítulo.

	1ª Campaña	2ª Campaña	3ª Campaña
SS (Total+Espec)	3+3	8+1	3+3
IN (Total+Espec)	0+1	2+1	0+0
IA (Total+Espec)	1+1	0	0
Glucosa	2	2	1
Proteínas	2	2	3

El análisis de las correlaciones que presentan las actividades de la degradación de la sacarosa se realizó utilizando los datos de los tres ensayos de campo (túneles, microtúneles y riego). Pasamos a analizar estas correlaciones para completar el análisis.

#### 3.2.4.1. SS: movilizandore reservas para el desarrollo fenológico.

En la tabla 2.9 se presentan las correlaciones encontradas de la actividad SS con el resto de actividades enzimáticas analizando conjuntamente los datos de las tres campañas. Se muestra que la actividad específica de SS (U/mgprot) presenta correlaciones positivas con la actividad Invertasa Neutra (IN) específica.

**Tabla 2.9.** Correlaciones entre la actividad SS total y específica y el resto de actividades enzimáticas durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-6}$ .

Variable 1	Variable 2	CP (r)	n
SS-U/mgprot	InvNeutra- U/mgprot	0,510	91

En la tabla 2.10 se presentan las correlaciones de la actividad SS con el resto de parámetros seguidos: agronómicos, climáticos y metabólicos. Sólo se han encontrado correlaciones con la actividad total de la SS. Puede observarse que la actividad SS total se correlaciona con una serie de parámetros agronómicos. La mayor correlación se da con la temperatura mínima (fila 5). Esta correlación es inversa como la correlación que se da con la temperatura media (fila 13). Esto indicaría que mayores temperaturas mínimas y medias disminuirían la actividad SS. Esto refuerza lo comentado anteriormente, la actividad SS parece ser más sensible a las temperaturas mínimas que a las máximas.

La actividad SS total también presenta correlaciones inversas con la integral térmica (fila 6) y con las medidas de integral térmica acumulada (filas 7-9). Esto reforzaría lo observado en las campañas, que **la actividad SS disminuye cuando avanza la edad del cultivo** y existe una **relación por tanto, entre la actividad de esta enzima y el estado fenológico de la planta**. La actividad SS frente a la ETo presenta correlación negativa en el mismo número de muestras que en la integral térmica. Esta correlación se da con las ETo acumuladas (filas 10, 11, 12).

La actividad SS también presenta correlaciones interesantes de tipo inverso, con los parámetros agronómicos de producción de raíz (fila 1), azúcar por hectárea (fila 2) y producción de masa seca de raíz (fila 3). Estas correlaciones concuerdan con lo observado para el grado día. Al aumentar el tamaño de la raíz acumuladora y la cantidad de azúcar, disminuye la actividad SS. Esto podría indicar también que **la disminución de esta actividad, permite la acumulación de sacarosa.**

**Tabla 2.10.** Correlaciones entre la actividad SS total y específica y los parámetros climáticos y agronómicos durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-5}$ . Se marcan en negrita las correlaciones con significación  $<10^{-8}$ .

	Variable 1	Variable 2	CP (r)	n
1	ProdR	SS-U/gpf	-0,551	86
<b>2</b>	<b>Potasio</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>0,658</b>	<b>82</b>
3	Azúcar/Ha	SS-U/gpf	-0,578	81
4	Prod MSR	SS-U/gpf	-0,560	81
<b>5</b>	<b>Tª min</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,681</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>GDIA</b>	<b>SS-U/gpf</b>	<b>-0,613</b>	<b>75</b>
7	GDIA4d	SS-U/gpf	-0,593	75
8	GDIA6d	SS-U/gpf	-0,584	75
9	GDIA2d	SS-U/gpf	-0,557	75
10	EToC4d	SS-U/gpf	-0,548	75
11	EToC6d	SS-U/gpf	-0,546	75
12	EToC2d	SS-U/gpf	-0,519	75
13	Tª media	SS-U/gpf	-0,506	75

Los datos de las correlaciones encontradas a nivel global y por campaña, indican que la actividad SS tiene un importante papel en el desarrollo del cultivo, podría decirse que su mayor actividad se produce durante la etapa de crecimiento vegetativo de la planta. La actividad SS también está muy marcada por las condiciones climáticas. Se muestra que su relación con el contenido en nitrógeno de la planta o la producción de raíz, dependen de la campaña estudiada. Las condiciones diferenciales de cada campaña, determinan diferencias en la regulación de la actividad SS. En determinadas condiciones como las del 2004 y el 2005, la actividad SS se encuentra relacionada con la actividad IN.

#### 3.2.4.2. *Invertasa Neutra*

La actividad IN total se correlaciona de forma directa y muy significativa en todas las campañas, con la cantidad de nitrógeno alfa amino en raíz, con la cantidad de potasio y de sodio (Tabla 2.11). También se encuentra correlación significativa y positiva a nivel global entre la actividad total de SS y de la IN. Estas correlaciones parecen relacionar la actividad degradativa de la IN con situaciones de crecimiento de la planta como consecuencia del estado fenológico o por otras situaciones como regeneración foliar. Ha sido descrito que esta enzima presenta sus máximos de actividad en febrero, cuando la planta está en pleno crecimiento. A partir de ahí comienza a descender. En condiciones de exceso de nitrógeno en el suelo puede presentar picos de actividad en agosto (Jiménez Segovia 2004)

**Tabla 2.11.** Correlaciones entre la actividad IN total y específica y el resto de actividades enzimáticas durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Todas las correlaciones tienen una  $\text{sign.} < 10^{-6}$ .

Variable 1	Var2	CP (r)	n
AAmino	IN- U/gpf	0,590	82
Potasio	IN- U/gpf	0,558	82
Sodio	IN- U/gpf	0,544	82
SS- U/mgprot	IN-U/mgprot	0,510	91

#### 3.2.4.3. *Invertasa ácida*

La actividad IA no presenta correlaciones a nivel global con ningún parámetro debido a la gran dispersión que suelen mostrar los valores en cada muestro.

### 3.3. ADENILATOS COMO ÍNDICE DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE LA RAÍZ DE LA REMOLACHA

---

Los niveles de adenilatos en la raíz acumuladora están determinados principalmente por el programa de desarrollo de la planta en interacción con amplios cambios ambientales (fotoperiodo, tendencias de las temperaturas). Sin embargo, cuando el sistema metabólico de la raíz está activo, como sucede en las plantas de siembra otoñal, pueden detectarse variaciones en los niveles de adenilatos en respuesta a situaciones puntuales de estrés (Jiménez 2004). La última fase del metabolismo respiratorio de los carbohidratos está asociada a la síntesis de ATP en las mitocondrias. Si la demanda de ATP en la planta es alta, se respiran los carbohidratos sintetizados para satisfacerla, siempre que haya ADP disponible para la síntesis de ATP. En general una relación ATP/ADP alta sugiere una situación de alta actividad metabólica (García-Mauriño et al. 2005b). Por esto, durante los ensayos con túneles se determinaron los niveles de ATP y ADP en la raíz de la remolacha que permitirían evaluar el estado metabólico de la raíz acumuladora y detectar situaciones de estrés.

Durante las dos campañas en la que se midieron estos parámetros, **1ª campaña y 2ª campaña**, se observó que los valores de ATP y ADP obtenidos fueron en general, mucho más bajos que los de las anteriores campañas muestreadas por nuestro grupo. En anteriores muestreos, los niveles de ATP permanecían por encima de 15 nmol g<sup>-1</sup>pf para cualquier fecha y los de ADP llegaban a alcanzar 10 nmol g<sup>-1</sup>pf para fechas similares a las muestreadas durante las campañas del 2004 y el 2005. Esta diferencia en los niveles de adenilatos con anteriores campañas, podría deberse a que esta variedad funciona a una menor tasa metabólica o a las condiciones climáticas.

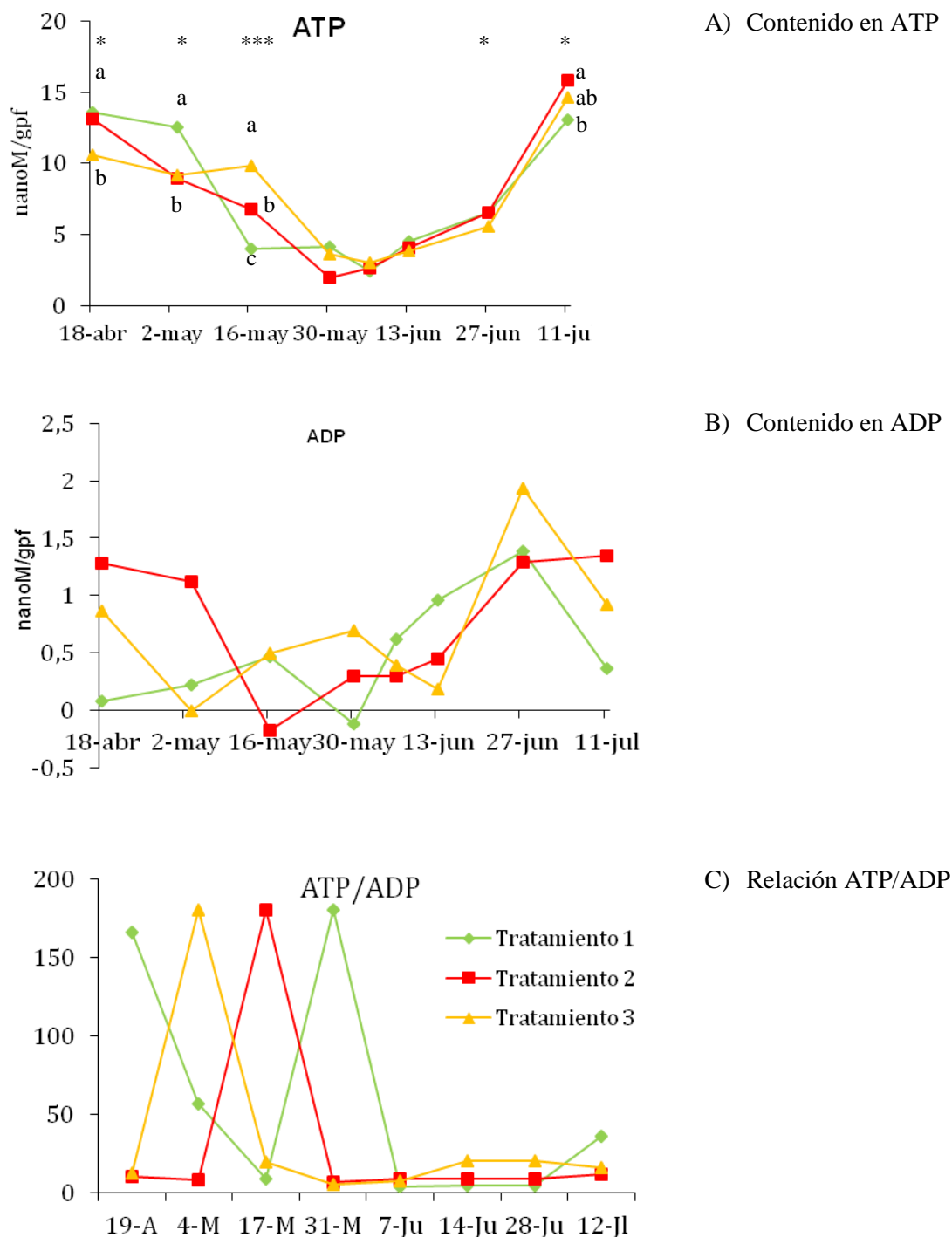
#### 3.3.1. 1ª Campaña (2003-2004)

---

Durante la **1ª campaña** (2004-2005) los valores de ATP y ADP en la raíz de remolacha van descendiendo hasta junio en las tres condiciones de manejo (Fig. 3.1, A y B). Además se observan altas oscilaciones en la relación ATP/ADP (Fig. 3.1, C). Estos valores indican una alta tasa metabólica en la raíz, debida posiblemente a que durante este periodo este órgano se encuentra en crecimiento. A partir del 7 de junio (5º muestreo) va aumentando el contenido en ATP y en ADP y se estabiliza la relación ATP/ADP. Esta combinación muestra que la raíz se encuentra en un periodo de estabilidad metabólica, donde no se produce nueva síntesis de biomasa. También indicaría que las raíces no se encuentran sometidas a estrés. En el último muestreo (11 de julio) esta situación varía ligeramente, observándose un ligero aumento de la relación ATP/ADP en T1, debido a que en dicho tratamiento los valores de ADP caen por debajo de 0,5 nmol g<sup>-1</sup>pf, mientras que en T1 y T2 permanecen alrededor de 1 nmol g<sup>-1</sup>pf. Ha sido descrito que en el momento pre cosecha, las

remolachas de siembra otoñal presentan un metabolismo activo, capaz de variar en respuesta al estrés. En el momento de la cosecha, las remolachas de siembra otoñal acumulan mayor cantidad de prolina y de glucosa en las raíces que las de siembra primaveral. Ambos metabolitos están asociados al estrés: la prolina se acumula como osmolito compatible para restaurar el equilibrio hídrico y la glucosa que indicaría una movilización de la sacarosa (García-Mauriño et al., 2005a). En este último muestreo de la primera campaña en la condición control se dan dos de las situaciones anteriormente descritas: aumenta la relación ATP/ADP y la cantidad de prolina (presenta el máximo en este muestreo para esta condición, 4,5 nmol g<sup>-1</sup>pf, ver capítulo 3.4).

Los tratamientos T2 y T3 permanecen con valores similares. En general, los valores de la relación ATP/ADP de esta campaña son bajos, y se puede considerar que están en relación a una baja situación de estrés de la planta durante la fecha de recolección, datos que están de acuerdo con las condiciones climáticas suaves de los meses de junio y julio del periodo de recolección de la remolacha de esta campaña (ver capítulo 3.1, datos climáticos).



**Figura 3.1.** Primera campaña. Evolución del contenido en adenilatos y de la relación ATP/ADP a lo largo de los muestreos del ensayo de golpe de calor en las tres condiciones de cultivos. Tratamiento 1, control (-♦-) T1; Tratamiento 2, tunel cerrado (-■-) T2; Tratamiento 3, tunel ventilado (-▲-) T3. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

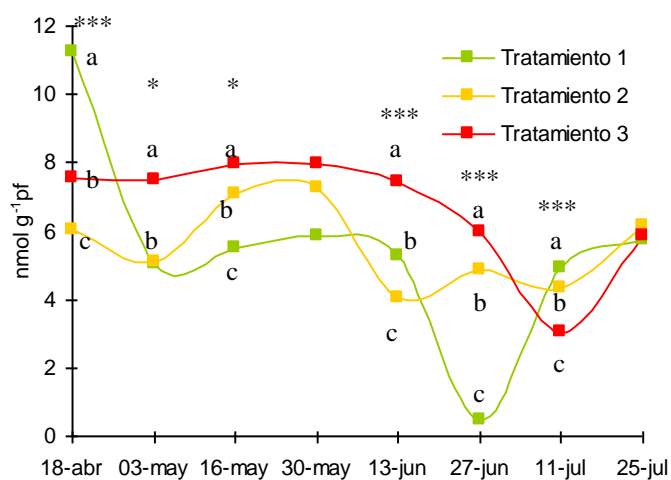
### 3.3.2. 2ª Campaña (2004-2005)

---

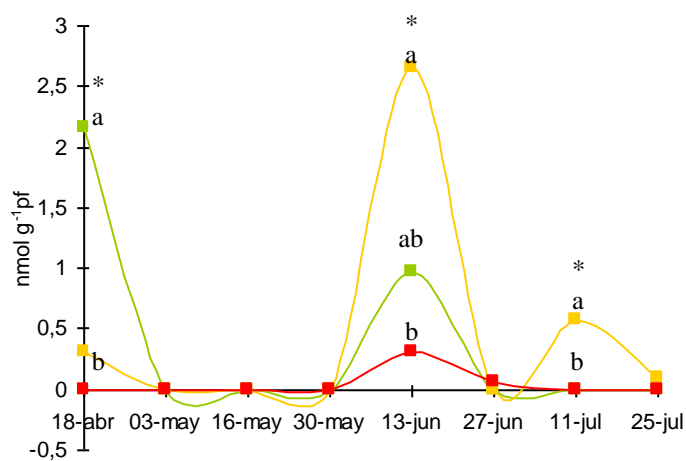
Los ensayos de adenilatos se repitieron en la campaña 2ª. En nuestros ensayos de la **2ª campaña** (2004-2005) se obtienen valores de ATP y ADP en general más bajos que los de la primera campaña (Fig. 3.2, A y B). En general llama la atención los bajos niveles de ADP registrados en prácticamente todos los muestreos y todas las condiciones (Fig. 3.2), acompañados de altas relaciones ATP/ADP que indicarían una alta actividad metabólica.

Las raíces de la situación control (T1) y las de los tratamientos (T2 y T3) siguen perfiles similares, pero manteniendo T3 (extremo cerrado del túnel) mayores valores de ATP prácticamente en todos los muestreos (Fig. 3.2, A). En cuanto a los niveles de ADP, presentan máximos en todos los tratamientos para el muestreo del 13 de junio (Fig. 3.2, B) y un máximo para el control y T2 en el muestreo del 18 de abril (Fig. 3.2, B). El día 12 y 13 de junio se registró un importante mínimo en la temperatura máxima según se observa en la Fig. 3.3. Esto pudo permitir un descenso en la actividad metabólica que pudo ser registrado al coincidir con el muestreo. En el resto de muestreos los niveles de ADP son prácticamente 0. Las diferencias entre el control y T3, indican un estado metabólico general diferente en T3 respecto al control. El tratamiento 3 presenta una mínima cantidad de ADP en los muestreos del 18 de abril y del 13 de junio. Esto podría estar relacionado con que las plantas del interior del túnel 3 presentan una mayor tasa metabólica y mayor actividad respiratoria que la condición control en ese muestreo. Ha sido descrito que las remolachas de siembra otoñal presentan un metabolismo activo durante el periodo de cosecha (junio, julio) relacionado con las altas temperaturas del verano de la siembra otoñal (García-Mauriño et al., 2005b). Esto les permite responder a las necesidades ambientales para aclimatarse a las condiciones de estrés. En nuestro caso, la relación ATP/ADP se mantiene alta para las tres condiciones de cultivo en casi todos los muestreos y en un número mayor de muestreos en el T3 (túnel cerrado). En el túnel T3 hay que destacar que el registro del primer muestreo es muy alto comparado con los otros dos tratamientos. Teniendo en cuenta que se produjo un golpe de calor con un aumento de 15 °C en el T3 respecto del control, justo en las fechas previas al 14 de abril, fecha en la que se abrió el túnel, estos valores altos de la relación ATP/ADP (Fig. 3.2 C primer muestreo) parecen reflejar adecuadamente la situación de estrés de T3 en esta fecha. Estos valores son por tanto indicativos de un cultivo que mantiene una alta actividad metabólica de acuerdo con las mayores temperaturas y menor disponibilidad hídrica que se registraron durante el periodo de recolección de la 2ª campaña. Los datos recogidos muestran que de los tres tratamientos fue el túnel sin ventilación T3 el que mantuvo mayor actividad metabólica incluso en los muestreos previos a la recolección lo que sin duda se vio reflejado en un menor rendimiento de los parámetros agronómicos relacionados con la producción de raíz y la producción de sacarosa (Capítulo 3.1, Fig. 1.10 A y B).

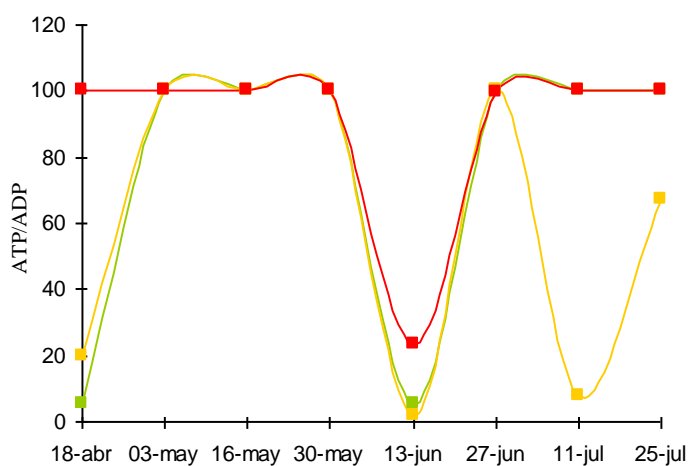




A) Contenido en ATP

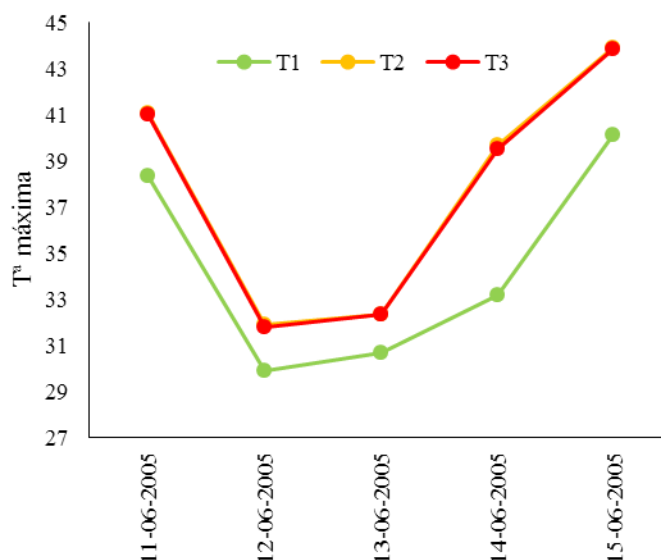


B) Contenido en ADP



C) Relación ATP/ADP

**Figura 3.2.** Segunda campaña. Evolución del contenido en adenilatos y de la relación ATP/ADP a lo largo de los muestreos del ensayo de golpe de calor en las tres condiciones de cultivos. Tratamiento 1, control (-■-) T1; Tratamiento 2, extremo abierto del túnel (-■-) T2; Tratamiento 3, extremo cerrado del túnel (-■-) T3. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

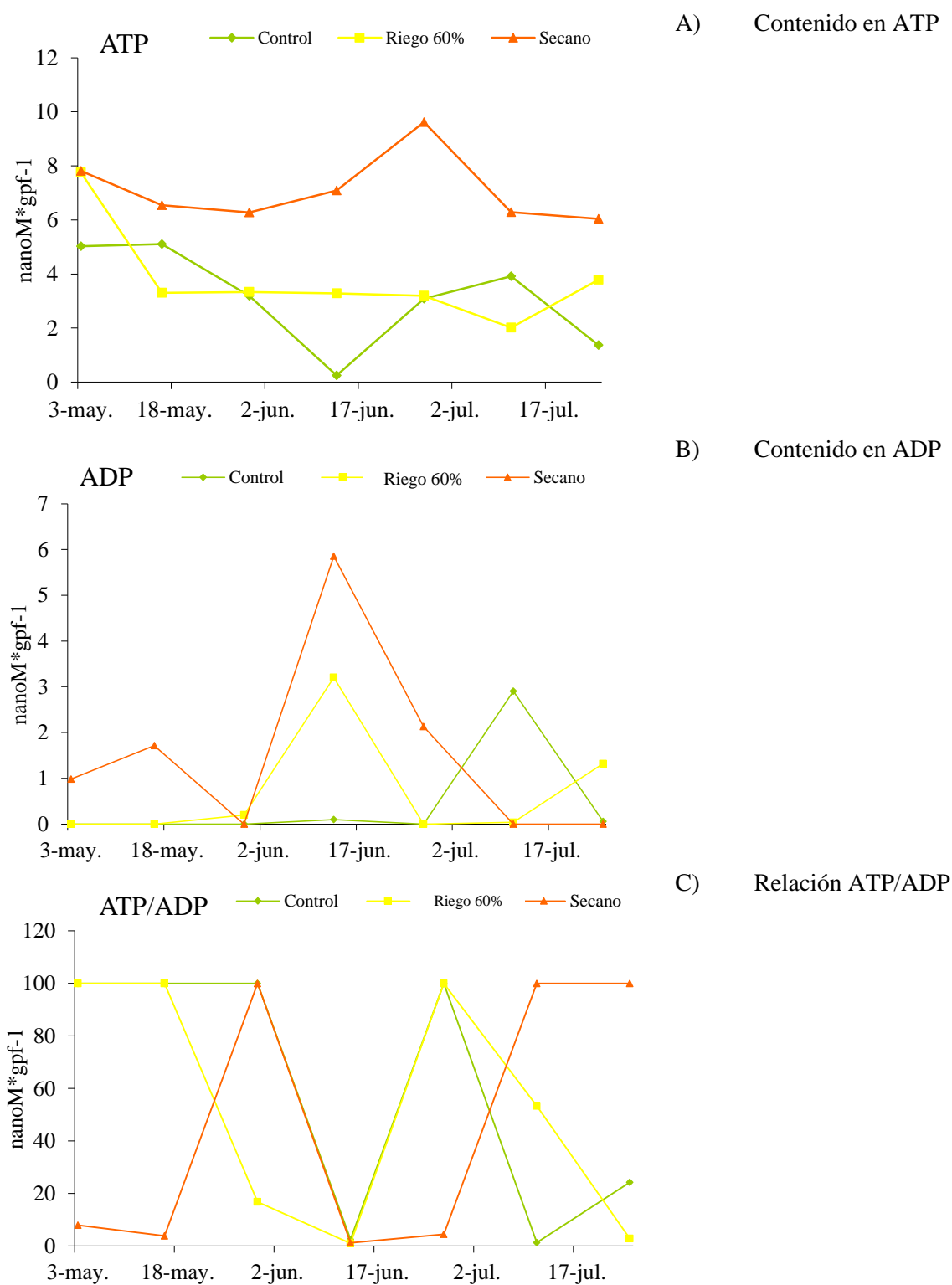


**Figura 3.3.** Evolución de las temperaturas máximas en los días previos y posteriores al 13 de junio, fecha en la que aumentan los contenidos en ADP. Las líneas marcan la evolución en los distintos tratamientos: T1, control; T2, plantas en la zona abierta del túnel; T3, zona cerrada del túnel.

### 3.3.2.1. Evolución de la cantidad de adenilatos en el ensayo hídrico

Debido a las condiciones hídricas limitadas durante esta **segunda campaña**, también se siguieron los **niveles de adenilatos en un ensayo hídrico**, donde las plantas fueron sometidas a tres condiciones hídricas diferentes: riego 100% de ETc, riego 60% de ETc y secano (sin aporte de riego). En la figura 3.4 se muestran los niveles de adenilatos y la relación ATP/ADP para este ensayo. En cuanto a los niveles de ATP presentan valores dentro del rango de los encontrados en el ensayo térmico. En la comparación entre condiciones de ensayo, los niveles de ATP permanecen más altos para todos los muestreos en la condición de secano frente a las dos condiciones de riego. Los niveles de ADP muestran para las condiciones de riego, valores dentro de lo observado en el ensayo térmico, excepto la condición de secano, que alcanza para este parámetro valores del doble de lo observado para el resto de condiciones durante el 2005 y tres veces más alto de lo observado en el 2004. El máximo para este parámetro en la condición de secano, se produce en el muestreo del 13 de junio. La condición de riego restringido también muestra un máximo en esta fecha que coincide además con máximos en el ensayo térmico (Fig. 3.2, B). Este pico de ADP debió ser consecuencia de condiciones ambientales o de manejo no relacionadas con los ensayos, ya que se produjo indistintamente en el ensayo térmico y en el hídrico. Sin embargo, los datos climáticos indican que en las fechas previas al muestreo del 13 de junio descendió la temperatura máxima (de 37 °C a 25,9 °C), aumentó la humedad mínima (del 15% al 41,7%) y disminuyó por tanto la ETo (de 8 a 5,9) lo que está de acuerdo con una bajada de la relación ATP/ADP al suavizarse, aunque puntualmente, las condiciones climáticas.

Además ratifican que durante la segunda campaña se produjo un efecto significativo sobre las remolachas del tratamiento 3, que mantienen una mayor tasa metabólica en el periodo de estudio (Fig. 3.2 C), subrayando lo observado en la remolacha de siembra otoñal sobre el aumento de la relación ATP/ADP en respuesta a estrés.



**Figura 3.3.** Evolución del contenido en adenilatos a lo largo de los muestreos del ensayo de Restricción hídrica. (---) Control; (---) Riego al 60%; (---) Secano. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias de tratamientos explicadas en el texto.

### 3.3.3. Correlaciones de los distintos parámetros estudiados con los adenilatos de la raíz.

#### Adenilatos: fotografía del estado metabólico de la raíz

Como se ha señalado en apartados anteriores, los niveles de adenilatos en la raíz acumuladora están determinados principalmente por el programa de desarrollo de la planta en interacción con amplios cambios ambientales (fotoperiodo, tendencias de las temperaturas, riegos, etc.). Sin embargo, cuando el sistema metabólico de la raíz está activo, como sucede en las plantas de siembra otoñal en periodo de cosecha, pueden detectarse variaciones en los niveles de adenilatos en respuesta a situaciones puntuales de estrés (Jiménez, 2004).

La relación ATP/ADP se correlaciona de forma inversa (tal como indica el signo negativo del coeficiente de correlación R) con parámetros relacionados con la cantidad de hojas (LAI, hojas por planta, materia seca de hojas) y con la producción por planta (Tabla 3.1), es decir que a mayor relación ATP/ADP menor LAI, menor cantidad de hojas por planta (Hojas/Planta), menor contenido en materia seca de hojas (Prod MSH) y menor producción por planta (Pro Planta). Una mayor tasa ATP/ADP indica un metabolismo activo bien por crecimiento de la planta o bien en respuesta a situación de estrés (García-Mauriño et al., 2005b). Las correlaciones obtenidas muestran que la alta relación ATP/ADP de estas campañas estarían en relación con situaciones de estrés producidas por las altas temperaturas registradas en las parcelas durante el periodo de recolección, excepto en la campaña 1, más que con situaciones de mayor crecimiento y desarrollo de la planta, lo que está de acuerdo con una baja producción y menores parámetros foliares (Fig. 1.10 A, B, C y D; Fig. 1.16, A, en capítulo 3.1).

**Tabla 3.1.** Correlaciones encontradas entre los valores de adenilatos y los parámetros agronómicos durante la primera y la segunda campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-4}$ .

Variable 1	Variable 2	C.P. (r)	N
LAIp	Adenilatos-ATP/ADP	-0,554	45
Hojas/Planta	Adenilatos-ATP/ADP	-0,538	53
Prod Planta	Adenilatos-ATP/ADP	-0,514	67
Prod MSH	Adenilatos-ATP/ADP	-0,512	53

### **3.4. ESTRÉS TÉRMICO VERSUS ESTRÉS HÍDRICO: PROLINA Y PARÁMETROS HÍDRICOS**

---

La acumulación de prolina en el citoplasma es un mecanismo utilizado por las células para aumentar la osmolaridad y disminuir así el potencial hídrico, facilitando la entrada de agua en el citoplasma. Es un mecanismo de respuesta de las plantas ante una situación de estrés hídrico (Yeo 1998; Ghoulam et al. 2002).

Además, es conocido que uno de los efectos de las altas temperaturas es que provocan déficit hídrico en la planta ya que, aun habiendo agua en el suelo, se produce un desequilibrio entre la pérdida de agua por transpiración y la velocidad de incorporación de agua por absorción. Esto es así incluso cuando la planta crece en cultivos hidropónicos sometidos a 40 °C (datos sin publicar). Uno de los indicadores utilizados para evaluar el estado hídrico de los tejidos es la prolina (Monreal et al. 2007), razón por la que se ha valorado este osmolito compatible en este estudio.

#### **3.4.1. Prolina durante la campaña 2003-2004 (1ª campaña)**

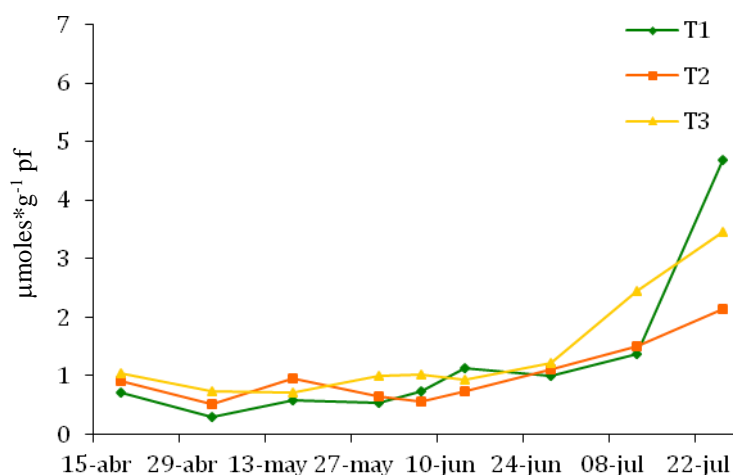
---

Durante la 1ª campaña se muestreó la evolución de los niveles de prolina de la raíz acumuladora en las tres condiciones del ensayo de túneles. En la figura 4.1 se muestra cómo evoluciona el perfil de prolina manteniéndose con escasas oscilaciones en todos los tratamientos hasta julio, fecha en la que comienza el incremento de los niveles de prolina. Este es un perfil similar al observado en campañas anteriores estudiadas por nuestro grupo (Monreal et al. 2007). Los valores de la figura 4.1 muestran que los mayores incrementos de prolina se dan en T1 (parcela control), en los muestreos de julio previos al periodo de recolección, seguidos de T3 (túnel ventilado) y por último de T2 (túnel sin ventilación), indicando que los túneles han tenido un efecto paliativo del estrés que han sufrido las remolachas sin cubrir.

Los niveles de acumulación de prolina han mostrado variaciones en campañas anteriores en función de la variedad empleada y de la situación de riego o déficit hídrico (Monreal et al. 2007). En campañas anteriores se observó que en condiciones de secano comienza antes la acumulación de la prolina en la raíz que en condiciones de riego, y también que hay variedades que acumulan más prolina que otras. En este sentido, la variedad llamada Claudia acumuló más prolina que la variedad Ramona (Monreal et al. 2007). Comparando nuestros resultados con los de campañas anteriores encontramos que las raíces del tratamiento T3 (túnel con ventilación) alcanzan los valores de prolina en recolección semejantes a remolachas testadas en campañas anteriores tanto de la variedad Claudia como de Ramona en condiciones de riego (aproximadamente unos 3  $\mu\text{moles/gpf}$ ). Las raíces del tratamiento T2 (sin ventilación) alcanzan valores de prolina semejantes a la variedad Ramona para

esas mismas fechas (2  $\mu\text{moles/gpf}$ ). Por último, las remolachas de la parcela control (T1), presenta los valores más altos, de unos 4,33  $\mu\text{moles/gpf}$ , que son similares a los encontrados en la variedad Claudia en las condiciones de secano. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los niveles de prolina mayores se dan en T1 (parcela control) con valores de humedad inferiores y mayor transpiración que los obtenidos para los túneles.

Resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo mostraron que los niveles de prolina en la raíz pueden también incrementarse en respuesta a niveles altos de nitrógeno incorporado por la planta (en igualdad de condiciones hídricas, acumulan más prolinas las plantas con mayor concentración de nitrógeno incorporado) (Jiménez 2004; Monreal et al. 2007). De hecho, se ha propuesto que la prolina puede ser utilizada por plantas de tabaco para asimilar el exceso de amonio, actuando como una forma adicional de almacén de nitrógeno (Brugiere et al. 1999).



**Figura 4.1.** Evolución de la cantidad de prolina ( $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$  peso fresco) en la raíz acumuladora a lo largo del ensayo. (-♦-) T1; (-■-) T2; (-▲-) T3.

También se ha constatado, en campañas anteriores, una correlación positiva en la raíz entre la acumulación de prolina y de glucosa que podrían estar producidas por la misma señal externa relacionada con una situación de estrés hídrico. El estrés provoca una movilización de las reservas de la raíz, que se traduce en un aumento de la actividad invertasa ácida y de la degradación de sacarosa, produciendo glucosa y fructosa. Esta glucosa puede ser acumulada o metabolizada, y utilizada también para la síntesis de prolina (Jiménez 2004; Monreal et al. 2007). En este sentido la utilización de inhibidores de la actividad invertasa ácida tales como el DMDP (2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxipirrolidina) disminuyen la cantidad de glucosa y por tanto la de prolina (Jiménez 2004; Monreal et al. 2007). Sin embargo, en esta primera campaña, los niveles de prolina no han mostrado

relación con los niveles de glucosa ni con la actividad invertasa ácida como se encontró en campañas anteriores.

#### **3.4.1.1. Correlaciones de la prolina durante la primera campaña**

Durante esta primera campaña la prolina de la raíz presenta correlaciones con alta significación con un alto número de factores (Tabla 4.1). Como se producen escasas variaciones entre los tratamientos, estas correlaciones tienen una interpretación estacional, influyendo de forma decisiva en la acumulación de prolina en la raíz las condiciones climáticas. Según los datos recogidos en la tabla 4, cabe destacar que son los parámetros relacionados con la producción y el contenido hídrico de las hojas los que presentan mayores coeficientes de correlación (C.P.). De las correlaciones establecidas con la **producción de hojas** se puede concluir que la **prolina de la raíz aumenta** cuando:

- Disminuye la cobertura y la producción de hojas (COB). Ambos parámetros responden a la misma señal, el déficit hídrico.
- Aumenta el porcentaje de materia seca de las hojas (PORMSH) y el limbo (PORMSL) parámetros ambos que se relacionan con una disminución de agua. Estos parámetros están altamente relacionados con el aumento de la demanda evaporativa del aire.

Estos datos en su conjunto señalan que la producción de prolina está coordinada con las señales de déficit hídrico recibidas por las hojas.

En esta campaña, la acumulación de prolina también tiene altas correlaciones (con algo menos de CP y de significación que en las hojas) con los **parámetros hídricos de la raíz**. En este sentido, estos datos indican que la **prolina de la raíz aumenta** cuando:

- Aumenta el brix, el % de materia seca de la raíz (PORMSR), la polarización, el nitrógeno proteico ( $N \alpha$ -amino), y la producción de azúcar (Azúcar/Ha). Todos estos parámetros están relacionados tanto con la disminución de la disposición hídrica como con el desarrollo del cultivo.

Finalmente existen correlaciones de interés entre la prolina y los datos climáticos. Así mismo podemos observar que **la prolina de la raíz aumenta**:

- Al disminuir la humedad relativa media y máxima (HRMEDIA).
- Cuando aumentan la temperatura máxima y la media.
- Cuando aumenta la evapotranspiración y evapotranspiración acumulada a dos días (EToC y EToC2d).
- Al aumentar la integral térmica, es decir los grados día (GDIA, GDIA2, GDIA4, GDIA6)



**Tabla 4.1.** Correlaciones entre la prolina de la raíz ( $\mu\text{moles/g}$  peso fresco) y los parámetros climáticos y agronómicos durante la primera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del ensayo térmico. CP: Coeficiente de Pearson. El signo negativo representa relaciones inversas. La ausencia de signo implica que son directas; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes (aún menores de 10<sup>-6</sup>).

	Variable 1	PROLINA EN RAÍZ	C.P. (r)	N
<b>Producción de hojas</b>	<b>COB</b>	<b>Prolina U/gpf</b>	<b>-0,885*****</b>	<b>24</b>
	<b>PORMSL</b>	<b>Prolina U/gpf</b>	<b>0,878*****</b>	<b>23</b>
	PORMSH	Prolina U/gpf	0,800*****	23
	ProdH	Prolina U/gpf	-0,773*****	24
<b>Raíz: materia soluble y materia seca</b>	BRIX	Prolina U/gpf	0,749*****	24
	PORMSR	Prolina U/gpf	0,770*****	24
	Polarización	Prolina U/gpf	0,719*****	24
	AAmino	Prolina U/gpf	0,714*****	24
	Azúcar/Ha	Prolina U/gpf	0,637***	24
<b>Parámetros climáticos</b>	HRMEDIA	Prolina U/gpf	-0,782*****	24
	GDIA	Prolina U/gpf	0,749*****	24
	GDIA4d	Prolina U/gpf	0,726*****	24
	HRMAX	Prolina U/gpf	-0,969*****	8
	GDIA2d	Prolina U/gpf	0,717*****	24
	Tª media	Prolina U/gpf	0,705***	24
	GDIA6d	Prolina U/gpf	0,678***	24
	Tª máxima	Prolina U/gpf	0,669***	24
	EToC	Prolina U/gpf	0,665***	24
	EToC2d	Prolina U/gpf	0,648***	24

### 3.4.2. Prolina durante la campaña 2004-2005 (2ª campaña)

En este apartado presentamos los resultados de los contenidos en prolina de las remolachas crecidas en los diferentes tratamientos de Tª (T1, T2, y T3) para evaluar el posible estrés hídrico provocado por el golpe de calor en T2 y en T3. En paralelo se desarrolló un ensayo de riego restringido con parcelas regadas según cantidad recomendada, parcelas en secano y con riego al 60% de la cantidad recomendada, según el balance hídrico del suelo (ver Materiales y Métodos para más detalles). En ambos ensayos se midió el contenido en prolina en los distintos órganos de la remolacha: raíz, peciolo y limbo.

En las figuras 4.2 y 4.3, se muestra la evolución de la acumulación de prolina a lo largo del cultivo en ambas condiciones de ensayo y en los tres órganos analizados. En el ensayo de riego restringido (Fig. 4.2.), el contenido en prolina fue máximo en secano, mientras que en riego del 60% y del 100%, no se acumuló prolina, indicando que el factor que desencadena dicha acumulación es

la restricción hídrica del suelo. Estos datos también apuntan a que el agricultor podría regar al 60% sin generar estrés en la planta, lo que sería una economía de agua importante. Además, en este ensayo, no se acumuló prolina en las hojas, y muy poco en el peciolo. El máximo de prolina se observó a finales de junio, para secano. Sin embargo, para riego 100% y 60% se produce una pequeña acumulación en julio, coincidiendo con la finalización de los riegos. Por el contrario, en el ensayo de golpe de calor con el túnel (Fig. 4.3), la prolina alcanzó su máximo nivel en la raíz en el muestreo del 16 de mayo, un mes después de abrir el túnel y tras haber sufrido un incremento de  $T^a$  respecto al exterior de 15 °C.

El pico de prolina en la raíz coincidió con los máximos puntuales en el peciolo y en la hoja, donde la prolina acumulada en la hoja superó la medida en la raíz (Fig.4.3). En este punto, más del 20 % de las plantas de la zona T3 habían muerto, y las supervivientes habían perdido aproximadamente el 70 % de las hojas (Fig.1.10C).

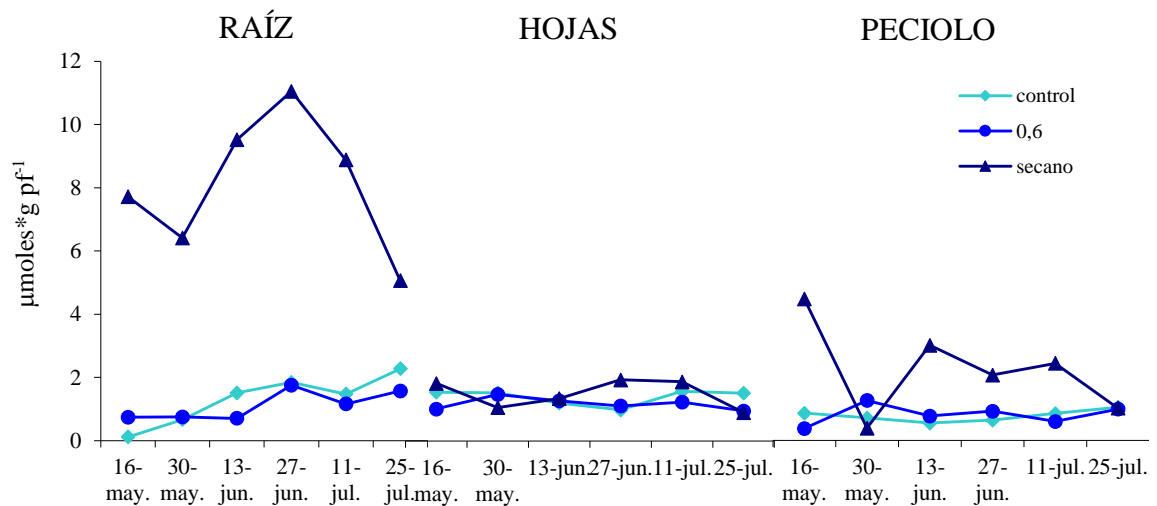
Estos resultados ponen en evidencia una respuesta diferencial de la acumulación de prolina en los diferentes órganos dependiendo de que la restricción hídrica sea por riego restringido paulatino que permite la aclimatación, o por golpe de calor, que llevó a un desbalance en el flujo transpirativo y a la pérdida masiva de las hojas.

Para dar consistencia estadística a esta hipótesis, se relacionaron los datos de prolina de los tres órganos con diferentes parámetros agronómicos y fisiológicos usados como índices del estado hídrico y de acumulación de sustancias en disolución (Morillo-Velarde & Ober, 2006). Estos parámetros fueron el porcentaje de materia seca de raíz (PORMSR), porcentaje de materia seca de hoja (PORMSH), brix de la raíz (BRIX raíz) y superficie foliar específica (SFEMS) (Recogidas en las gráficas 10 J, H, F, G del capítulo 3.1).

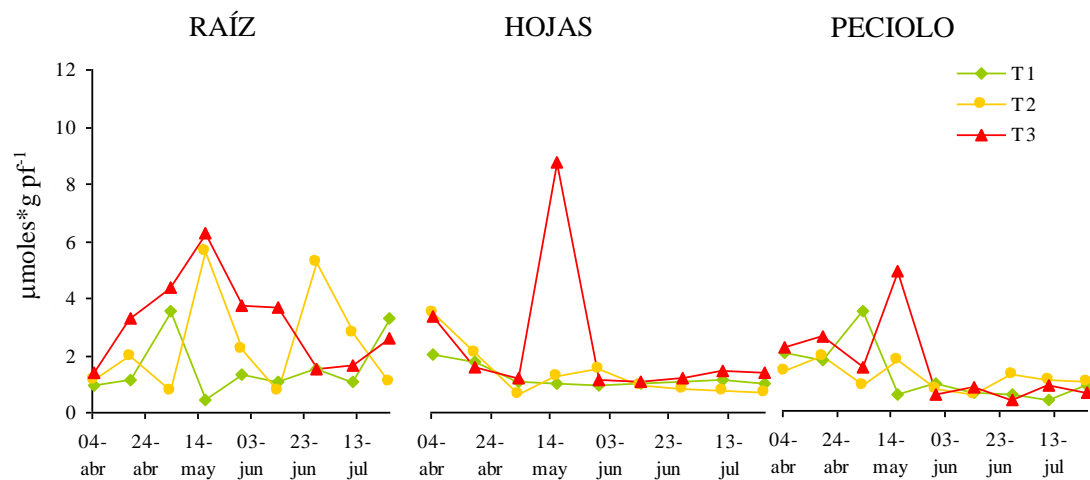
Los resultados de la tabla 4.2 muestran que, en ambos ensayos, fue la prolina acumulada en la raíz, y no la acumulada en la hoja, la que mejor se correspondía con los parámetros hídricos estudiados. Sin embargo se hallaron diferencias importantes entre ambos tipos de ensayo. En el ensayo de riego restringido las correlaciones más significativas (\*\*) se establecen entre la prolina de la raíz y la materia seca de la raíz y con el brix de la misma. Por el contrario, en el ensayo del golpe de calor la prolina de la raíz se correlaciona con una alta significación (\*\*) con el SFEMS y con % de MS de la hoja. Hay que tener en cuenta que en este ensayo las plantas se encontraban en una situación de riego por lo que la prolina acumulada en la raíz lo hacía en respuesta al estrés hídrico en la hoja, o a la falta de hojas, y no a la falta de riego. Se ha descrito que un aumento drástico de la temperatura genera una señal de estrés hídrico en las hojas de remolacha, que tienen escasa capacidad para regular la transpiración (Hanson & Hitz 1982). La respuesta implica la pérdida de superficie de transpiración. El aumento de osmolitos en la raíz podría responder a la necesidad de aumentar el flujo de agua hacia la hoja. En situaciones críticas derivadas de un cierre estomático prolongado, la

remolacha, que tiene efectivos mecanismos para el ajuste osmótico (McCree & Richardson 1987), podría recurrir al acúmulo de prolina para disminuir el potencial hídrico de la raíz, consiguiendo así el movimiento del agua por presión radicular. En ausencia de transpiración (caída de las hojas y cierre estomático), la planta acumula prolina en la hoja estableciendo, de forma puntual, un gradiente de potencial hídrico favorable al flujo ascendente de agua. Por el contrario, en el ensayo de riego restringido la acumulación de prolina en la raíz responde al estrés hídrico de la raíz. En estas plantas la aclimatación al déficit hídrico permite ajustar la transpiración y el número de hojas, manteniendo la circulación del agua sin necesidad de acumular prolina en las hojas.

Colectivamente estos resultados indican que el contenido en prolina de la raíz acumuladora está relacionado con el estrés hídrico, siendo cuantitativamente mucho más importante en este órgano que en hojas y peciolo. También se puede concluir que la respuesta de *Beta vulgaris* al déficit hídrico es diferente según qué órgano de la planta reciba la señal. Se propone que la acumulación puntual de prolina en las pocas y pequeñas hojas de las plantas supervivientes en el ensayo de golpe de calor responde a la necesidad de la planta de, en ausencia de transpiración puntual, establecer el flujo de agua ajustando el contenido de osmolitos en la hoja (Fig. 4.4).



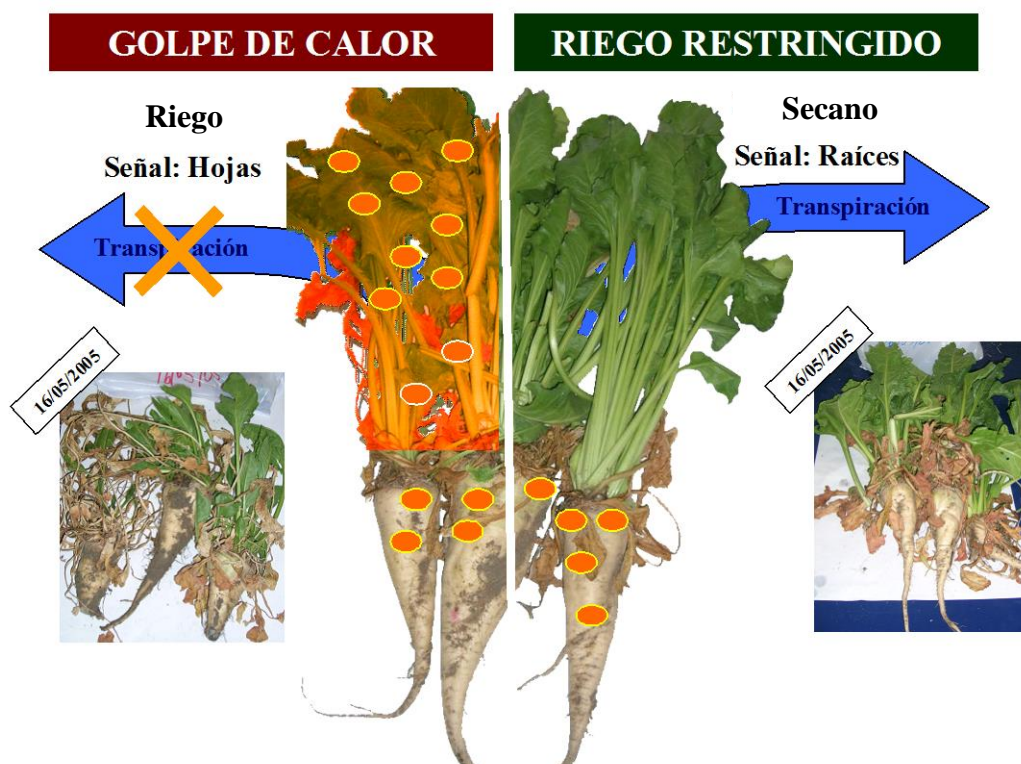
**Figura 4.2.** Evolución del contenido en prolina ( $\mu\text{moles} \cdot \text{g} \text{pf}^{-1}$ ) en los distintos órganos de la planta (raíz, hojas, peciolo) en el ensayo de riego restringido. Segunda campaña. (—♦—) Riego recomendado; (—●—) 60% del riego recomendado; (—▲—) secano.



**Figura 4.3.** Evolución del contenido en prolina ( $\mu\text{moles} \cdot \text{g} \text{pf}^{-1}$ ) en los distintos órganos de la planta (raíz, hojas, peciolo) en el ensayo de golpe de calor. Segunda campaña. (—♦—) T1: Control; (—●—) T2; (—▲—) T3.

**Tabla 4.2.** Correlaciones entre parámetros relacionados con el estado hídrico y el contenido en prolina de los distintos órganos en la 2ª campaña. N: número de muestras; CP: coeficiente de Pearson; (\*\*): significación <0,01; (\*): significación <0,05. Los signos positivos y negativos significan correlaciones positivas o negativas respectivamente. Con la colaboración de AIMCRA.

			Prolina Raíz	Prolina Peciolo	Prolina limbo
GOLPE DE CALOR	PORMSR	CP	,081	-,282	-,327
		N	25	25	25
	PORMSH	CP	<b>,595(**)</b>	,121	,111
		N	25	25	25
	BRIX	CP	,180	-,318	-,377
		N	27	27	27
	SFEMS	CP	<b>-,555(**)</b>	-,041	,014
		N	21	21	21
RIEGO RESTRINGIDO	PORMSR	CP	<b>,853(**)</b>	,568	,220
		N	11	11	11
	PORMSH	CP	,732(*)	,556	,607
		N	9	9	9
	BRIX	CP	<b>,813(**)</b>	,433	,394
		N	19	19	19
	SFEMS	CP	-,176	,110	-,323
		N	5	5	5



**Figura 4.4.** Modelo de la dinámica de la acumulación de prolina en los distintos órganos de la remolacha azucarera dependiendo del órgano que recibe la señal de estrés. Los ensayos realizados durante esta segunda campaña, golpe de calor y riego restringido, permitieron analizar diferentes patrones de acumulación de prolina.

### 3.4.3. Prolina en la campaña 2005-2006 (3ª campaña)

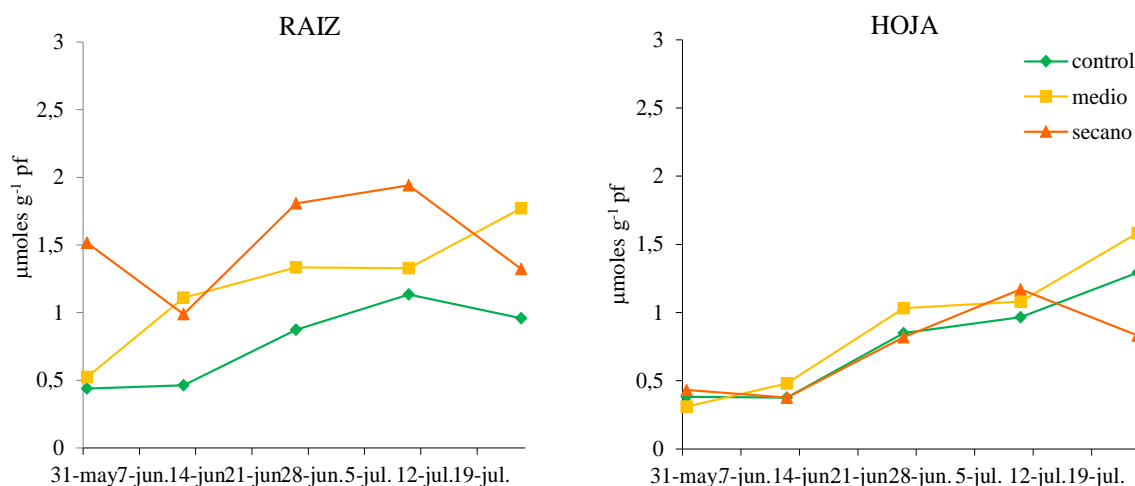
---

En la 3ª campaña se realizó nuevamente el ensayo térmico y se determinaron los contenidos de prolina de las remolachas crecidas en los diferentes tratamientos de Tª (T1, T2, y T3). Estos tratamientos se corresponden con los de la campaña anterior, es decir T1, parcela control sin túnel, T2, la mitad de la parcela cubierta con túnel, colindante con el lado abierto, y T3, mitad hacia el fondo cerrado del túnel (Fig. 1.11, capítulo 3.1). En paralelo se desarrolló de nuevo el ensayo de riego restringido con parcelas regadas, en seco y con riego al 60%. En ambos ensayos se midió el contenido en prolina de la raíz y el limbo. Se decidió no evaluar el contenido en los peciolo ya que en los ensayos del año anterior mostraban un comportamiento intermedio entre la raíz y el limbo.

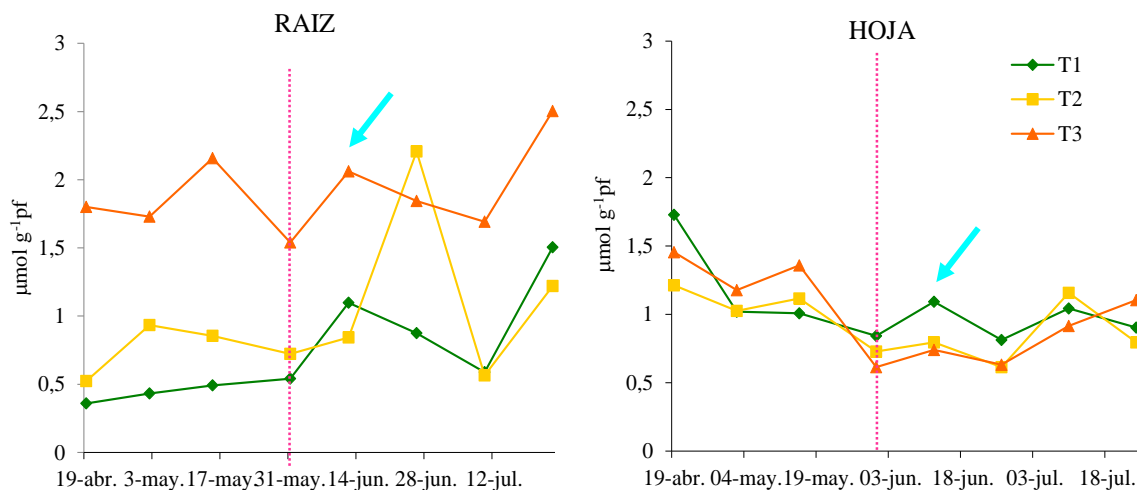
En la figura 4.5 y 4.6, se muestra la evolución de la acumulación de prolina a lo largo del cultivo en ambas condiciones de ensayo y en los dos órganos analizados. En el ensayo de riego restringido (Fig.4.5.), el contenido en prolina fue mayor en seco, seguido del riego al 60% y los valores más bajos se obtuvieron en el riego del 100%. Esta diferencia se observa en la raíz pero no hay diferencias en las hojas excepto en el último muestreo. Sin embargo, a pesar de las diferencias, cabe destacar que los valores máximos alcanzados en la raíz en seco durante esta campaña son equivalentes a los valores de riego al 100% de la campaña del 2005. Es decir, en esta campaña los valores de prolina obtenidos, en general, fueron mucho más bajos (a veces del orden de 7 veces más bajos dependiendo del muestreo) que los de la campaña anterior. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que durante esta campaña 2005/2006, el campo presentaba un mejor perfil hídrico debido a las lluvias naturales que permitieron a las remolachas de seco desarrollarse sin apenas estrés por falta de riego, lo que también pone de manifiesto un alto valor indicador de la medida de prolina en la raíz para establecer el estado hídrico de la remolacha del sur.

En el ensayo térmico, los valores de prolina registrados también fueron muy bajos comparados con los de la campaña anterior. Las raíces de T3 y de T1 presentan perfiles similares, con un aumento en el muestreo final, al igual que en la campaña del 2005. Cabe destacar que las raíces de T3 presentan niveles de prolina mayores que las del control, pero los máximos alcanzan sólo 2,5 mg/gpf, frente a los 6 mg/gpf alcanzados en este mismo ensayo en la campaña anterior. En la campaña del 2006 no se observa un aumento de prolina en las hojas de T3, que mantiene los mismos valores que las hojas de las plantas de T1. Esto está en relación con los parámetros agronómicos que muestran que en esta campaña, si bien las remolachas de los túneles se vieron afectadas en su apariencia (Fig. 1.14 y 1.15, capítulo 3.1), no se vio afectada la producción de hojas en T/Ha de los túneles respecto al control (Fig. 1.16, capítulo 3.1), al menos no de la forma en que se vio afectada en la segunda campaña, en la que el golpe de calor produjo una pérdida de hojas hasta valores inferiores a 10 t/Ha respecto de las 55 t/Ha del control. Estos perfiles de prolina en hojas y raíces, tanto en los ensayos de riego como de estrés térmico en esta campaña, refuerzan de nuevo la hipótesis de las mejores condiciones hídricas del suelo y de prácticamente ausencia de estrés en los

órganos de la planta. En este mismo sentido cabe destacar que la producción de hojas en t/Ha de esta campaña alcanzaron valores de hasta 85 t/Ha de valor máximo, respecto de la primera en la que se alcanzaron las 100 T/Ha), mientras que en la campaña segunda estos valores no superaron las 55 t/Ha (capítulo 1, datos agronómicos, Fig. 1.10, 1.16).



**Figura 4.5.** Evolución del contenido en prolina durante la 3ª campaña en los distintos órganos de la planta analizados (hoja, raíz) en el **ensayo de riego restringido**: (-♦-) Riego recomendado; (-■-) 60% del riego recomendado; (-▲-) secano.



**Figura 4.6.** Evolución del contenido en prolina en los distintos órganos de la planta en el **ensayo de golpe de calor** en los distintos órganos analizados (hoja, raíz).(-♦-) T1: Control; (-■-) T2; (-▲-) T3. Los muestreos del ensayo térmico comenzaron antes que los del ensayo de riego restringido. La línea indica cuando comienzan los muestreos del ensayo de riego restringido. La flecha indica el muestreo del 12 de junio en el que se produjo una caída del contenido hídrico relativo (CHR).

Colectivamente estos datos demuestran que las condiciones climáticas de las campañas estudiadas y no los túneles, fueron determinantes en el estado fisiológico de las remolachas y en la repercusión que esto tuvo en los parámetros agronómicos. De estos, los datos de la determinación de prolina ponen en evidencia que no es el aumento puntual de temperatura (golpe de calor) lo que tiene efectos dramáticos sobre el estado del cultivo y la producción, sino la combinación de un golpe de calor asociado a un estado hídrico deficitario en la planta. Esta combinación provoca una caída drástica de las hojas y una pérdida total en la producción.

#### **3.4.3.1. Contenido hídrico de la remolacha en las tres condiciones estudiadas**

Para obtener información sobre el estado hídrico real de la planta, en esta campaña se midieron para ambos ensayos el contenido hídrico (CH) y el contenido hídrico relativo (CHR) de las hojas (Figuras 4.7 y 4.8).

Los muestreos del ensayo de riego se empezaron el 31 de mayo. Durante el periodo muestreado los registros del CHR de la parcela de secano y la de riego al 60% fueron muy estables, excepto el pico del 12 de junio para el riego 60% y se mantuvieron en valores de entre un 70 -78 %. El control, sin embargo mostro más fluctuaciones cayendo al 65% de CHR en el último muestreo. En la bibliografía aparecen numerosas referencias a los intervalos de CHR que pueden alcanzar las plantas de remolacha bajo diversas condiciones de estrés. Estudios de modelización realizados sobre 317 especies en 72 estudios de diversos biomas (incluido el mediterráneo), han definido un valor umbral de RWC (CHR) en el punto de pérdida de turgor del 75% para evitar la inhibición metabólica (Bartlett et al. 2012). En estudios en *Beta vulgaris* sometida estrés hídrico en condiciones de campo y previa aclimatación, se han constatado CHRs para las hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico de 60%-65%. Las plantas control exhibían CHRs de entre 72%-85% (Hajheidari et al. 2005). Para hojas de remolachas sometidas a estrés salino han sido reportados valores de CHR entre 55% y 76% según la variedad, para 200 mM de NaCl durante 30 días. Las plantas control (0 mM NaCl) mostraban un CHR en torno al 78% para todas las variedades (Ghoulam et al. 2002). También han sido medidos CHR de entre el 44% y el 59% para diferentes genotipos (intolerantes o tolerantes a la sequía) de remolacha azucarera sometidas a condiciones de sequía durante 7 días. En condiciones de riego adecuado, los CHR presentaban valores de entre 55% a 74% (intolerantes/ tolerantes a la sequía) (Shaw et al., 2002). Las plantas mueren por debajo de CHR de entre el 20 y el 50% dependiendo de la especie por lo que según estos datos, excepto en muestreos puntuales del control, las plantas estarían en aproximadamente un 70 a 80% de su plena turgencia, lo que para las condiciones ambientales del verano andaluz, es un buen estado de hidratación. Esto se refleja en los bajos niveles de prolina obtenidos en esta campaña (con máximos del 1,5-2 mg/gpf) mientras que en la campaña anterior se alcanzaron valores del 10 mg/gpf. Esto mismo ocurre en el ensayo térmico, con fluctuaciones a lo largo de los muestreos que no se reflejan

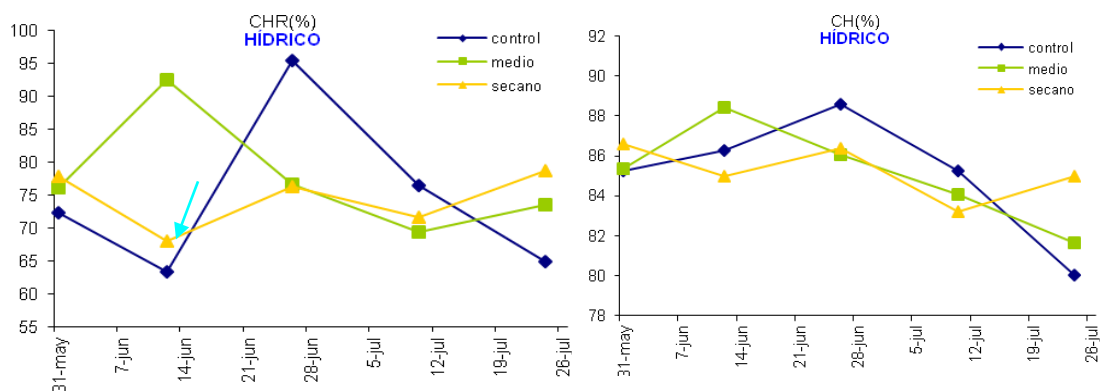


en los niveles de prolina determinados (Fig. 4.8, ensayo térmico, A y Fig. 4.6, ensayo térmico, hojas).

Cabe destacar el descenso del contenido hídrico relativo de las hojas en el muestreo del 12 de junio tanto para el ensayo de riego restringido (68-63%) como para el ensayo térmico (70-57%), excepto para el riego al 60%. Esta caída del CHR coincide con un aumento de la prolina en el ensayo térmico en hojas y raíces (Fig. 4.6). La acumulación de prolina en la remolacha es un proceso de respuesta rápida como se mostrará en el siguiente apartado. Esta disminución del CHR acompañada de los picos de prolina ilustra esta respuesta rápida de ajuste de la planta (Fig. 4.6, ensayo térmico, señalado con una flecha). Los perfiles de los CH siguen un perfil descendente a lo largo de los muestreos desde el 31 de mayo, sin embargo la disminución en el caso más drástico es solo del 8% (del 88% al 80 %), es decir, baja, lo cual se corresponde con valores estables de prolina en las hojas del ensayo de golpe de calor al final de la campaña (Fig. 4.6, hojas). En el ensayo de riego restringido el CH baja a valores del 60% en los muestreos finales, lo que se corresponde con un ligero ascenso de la prolina en el ensayo hídrico en las hojas (Fig. 4.6, hoja).

En su conjunto estos resultados avalan los niveles de prolina obtenidos y ponen de manifiesto que en la tercera campaña las condiciones hídricas de las remolachas de las diferentes parcelas, tanto en el ensayo hídrico como el térmico tuvieron un estado hídrico aceptable que no disparó la alarma de síntesis de osmolitos (prolina) en las hojas.

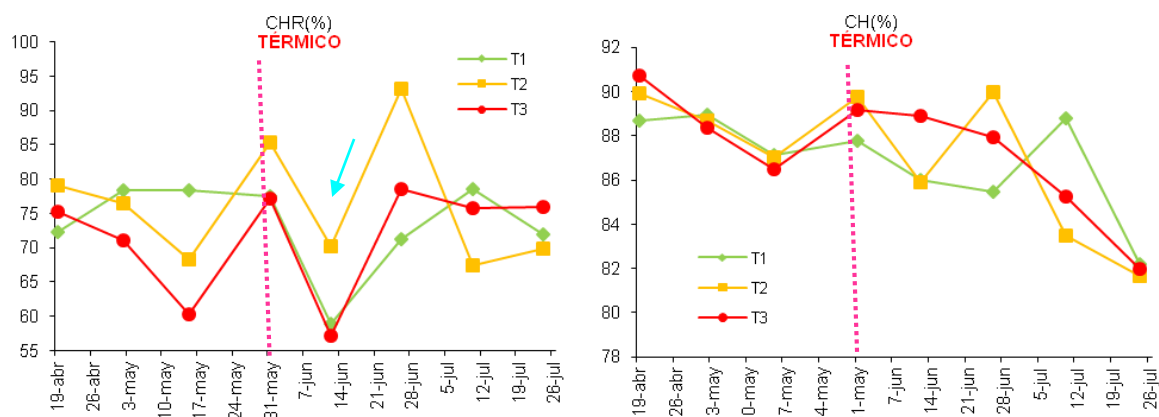
Finalmente, no se determinó el estado hídrico de la raíz, pero los niveles de prolina ponen de manifiesto, que, aun siendo muy bajos, las raíces de secano del ensayo hídrico, y del T3 en el ensayo térmico, son las que sintetizaron de media más prolina, lo que indica la necesidad de un ligero ajuste osmótico en esos ensayos.



A) CHR

B) CH

**Figura 4.7.** Evolución del contenido hídrico relativo (CHR, A) y contenido hídrico (CH, B) de las hojas en el ensayo hídrico. (—♦—) Control, (—■—) riego restringido, (—▲—) seco. La flecha indica el muestreo del 12 de junio.



A) CHR

B) CH

**Figura 4.8.** Evolución del contenido hídrico relativo (CHR, A) y contenido hídrico (CH, B) de las hojas en el ensayo térmico. (—♦—) T1, (—■—) T2, (—▲—) T3. La flecha celeste indica el muestreo del 12 de junio. La línea indica cuando comienzan los muestreos del ensayo de riego restringido.

### 3.4.3.2. Correlación entre los niveles de prolina y datos agronómicos durante la tercera campaña

También se analizaron en esta campaña las correlaciones de la acumulación de la prolina en los distintos órganos con los diversos parámetros estudiados. Se compararon los parámetros de los tres ensayos realizados: Ensayo térmico (túneles), riego restringido y golpe de calor en microtúnel. Este último ensayo consistió en la colocación de unas estructuras de plástico portátiles de 4mx4mx2m durante 15 días en diferentes zonas de la finca con el objetivo de producir golpes de

calor a las plantas. Se colocaron en diferentes lugares y en diferentes momentos del desarrollo de las plantas (abril, mayo, junio, julio) lo que permitió evaluar la influencia del aumento de temperatura en función del estado del cultivo. Los experimentos con los microtúneles se presentan en el capítulo 3.6, aunque en este capítulo hemos incluido alguno de los resultados en el análisis de correlaciones.

En la tabla 4.4 se muestran las correlaciones con coeficiente de Pearson en valor absoluto por encima de 0,5 y  $n \geq 4$ . Se hace evidente también en estas correlaciones, la diferencia de comportamiento de las plantas en el túnel. Cabe destacar la correlación entre la superficie foliar específica por materia seca (SFEMS) y la prolina en hojas que se produce tanto en el túnel como en el golpe de calor de los microtúneles. También se encontró esta correlación durante la anterior campaña, pero en ese caso fue una correlación inversa. El parámetro SFEMS es una medida de la proporción de agua que presenta la hoja. Mayor SFEMS indicaría mayor cantidad de agua. Por tanto, en esta campaña del 2006, mayor acumulación de prolina va acompañada de mayor cantidad de agua en la hoja. Esto, que podría parecer una contradicción, se ha observado en experimentos de laboratorio, y concuerda con lo observado en el contenido hídrico de las hojas. Ante un estrés moderado, la acumulación de prolina en hojas restituye el potencial hídrico foliar. Un estrés más dramático a nivel de las hojas, desencadena grandes picos de prolina para compensar los aumentos de este osmolito en la raíz, y ayudar al flujo de agua hacia las hojas. Durante esta última campaña, las plantas del túnel sufrieron menos déficit hídrico que durante la campaña pasada.

Cabe destacar también en las hojas del ensayo térmico, la correlación inversa con el brix de la raíz (BRIX) y con la materia seca de la raíz (Tabla 4.4, ensayo térmico). El estrés hídrico a nivel de la raíz disminuye la cantidad de prolina en hojas. Durante esta campaña se registraron valores más altos de humedad mínima en el aire que en la campaña anterior. La planta por tanto no necesita cerrar los estomas y la transpiración podría mantenerse sin necesidad de picos forzados de acumulación de prolina.

Otras correlaciones interesantes en el ensayo de túnel es la correlación de la prolina en las raíces con el nitrógeno alfa amino y el LAI. Esta correlación indica que además de la prolina, las raíces acumulan otros osmolitos como aminoácidos. La correlación inversa con el LAI responde a un conocido mecanismo de aclimatación de las plantas de remolacha: el déficit hídrico en el suelo desencadena la disminución del número de hojas.

En el ensayo de riego restringido, las correlaciones coinciden con lo observado en la campaña anterior. La prolina de la raíz tiene correlaciones positivas con los parámetros indicadores del estado hídrico: % de materia seca de raíz y de hojas y el brix. Y negativas con la producción de hojas. El déficit del suelo aumenta la prolina y el brix de la raíz y la materia seca de la planta y disminuye la producción de hojas. En cuanto a la prolina en las hojas, se correlaciona de forma inversa con la producción de hojas, el contenido hídrico y la humedad total mínima. Las condiciones de riego restringido si imponen un estrés hídrico más severo en hojas y raíces para el que la prolina es un importante mecanismo de aclimatación.

Por último, en los ensayos de golpe de calor puntual con microtúneles puede observarse una correlación inversa entre la prolina de la raíz y la actividad invertasa neutra específica. El sentido de esta correlación es inverso al que se observó en campañas anteriores en Claudia déficit hídrico (Jiménez, 2004), donde la disminución de la actividad invertasa disminuía la cantidad de prolina. En las correlaciones encontradas en la actividad invertasa neutra (capítulo 3.2) se muestra que esta actividad relacionada con los grados día y con la actividad SS, podría responder a procesos de crecimiento.

**Tabla 4.4.** Correlaciones entre parámetros relacionados con el estado hídrico y el contenido en prolina de los distintos órganos en la 3ª campaña. N: número de muestras; CP: coeficiente de correlación Pearson; (\*\*): significación <0,01; (\*): significación <0,05.

		ENSAYO TÉRMICO (Golpe de calor)		RIEGO RESTRINGIDO		Golpe de calor en MICROTÚNELES	
		Prolina Raíz	Prolina Hoja	Prolina Raíz	Prolina Hoja	Prolina Raíz	Prolina Hoja
PORMSR	CP		-0,524*	0,981*			
	N		21	4			
PORMSH	CP			0,952*			
	N			4			
BRIX	CP		<b>-0,524**</b>	<b>0,857**</b>			
	N		<b>24</b>	13			
SFEMS	CP		0,519*			<b>0,967**</b>	
	N		18			<b>4</b>	
NNJUP	CP		<b>0,856**</b>				
	N		<b>9</b>				
AAamino	CP	<b>0,716**</b>					
	N	<b>24</b>					
LAI	CP	<b>-0,645**</b>					
	N	<b>18</b>					
HRmín	CP	0,521*					
	N	16					
LBrix	CP				0,819*		
	N				8		
ProdH	CP			<b>-0,803**</b>	<b>-0,770**</b>		
	N			<b>14</b>	<b>13</b>		
CHH	CP				<b>0,672**</b>		
	N				<b>14</b>		
HTmin	CP				-0,587*		
	N				14		
Inv.Neutra Específica						-0,775*	
						8	

### 3.4.4. Ensayos en condiciones controladas

---

En las condiciones de campo, se siguió la acumulación de prolina en las plantas de remolacha sometidas a riego restringido o a incrementos de temperaturas. Estos ensayos mostraron que la prolina se acumula en la raíz, en la hoja o en ambas, dependiendo del órgano que recibe la señal y de los periodos de aclimatación (León et al. 2006). Se realizaron experimentos en condiciones controladas de laboratorio en los que se muestra la acumulación diferencial de prolina en los distintos órganos y distintas situaciones de estrés.

Se realizaron ensayos en condiciones controladas en cámara que buscaban independizar el efecto de la alta  $T^a$  del de la restricción hídrica producida por la alta evapotranspiración. Las plantas fueron sometidas a distintos tratamientos:

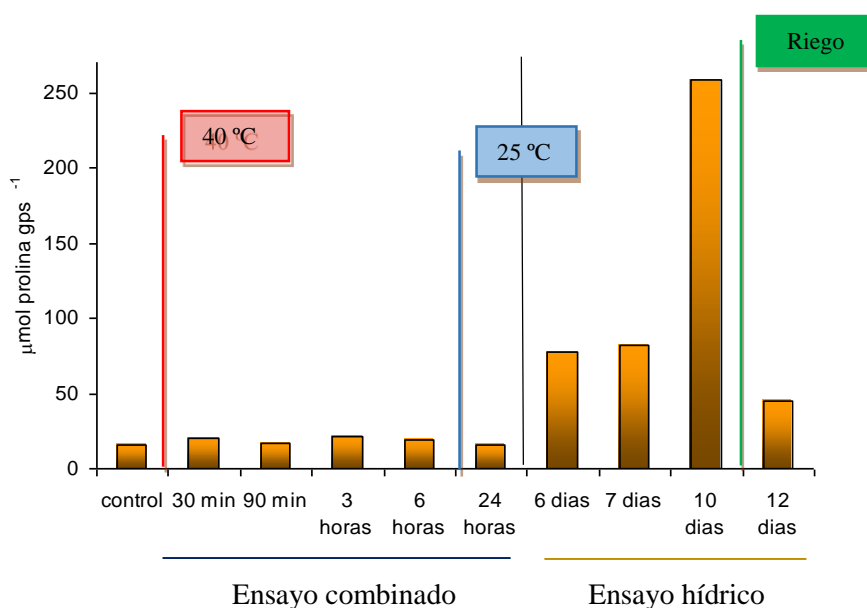
- **Ensayo combinado** (restricción hídrica ligera junto con alta temperatura): Plantas crecidas a 25 °C en perlita, fueron sometidas a tres días sin riego y posteriormente se les aplicó tratamiento térmico (40 °C de temperatura durante 6 horas, 50% de humedad relativa).
- **Ensayo térmico** (alta temperatura, disponibilidad hídrica): Se utilizaron plantas en cultivos hidropónicos o perlita bien regadas crecidas a 25 °C para minimizar la restricción hídrica durante los aumentos de temperatura. Estas plantas fueron sometidas a un aumento de temperatura de 40° C durante 6 horas.
- **Ensayos de restricción hídrica puntual** (estrés hídrico, temperatura suave). Se realizaron en plantas cultivadas en perlita bien regada y 25 °C, a los que se dejó sin regar durante 6 días.

En los ensayos se midió la prolina en los distintos órganos, junto con parámetros fotosintéticos y los parámetros agronómicos más representativos del estado hídrico de la planta (° Brix de la raíz, %MSH).

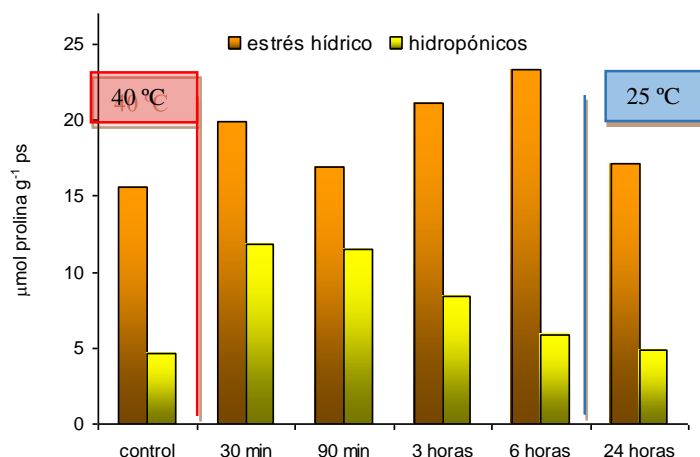
La figura 4.9 muestra que es el ensayo hídrico (Fig. 4.9, día 6, 7 y 10) y no el combinado con alta  $T^a$  y una restricción hídrica ligera (Fig. 4. 9, 30 min, 90 min, 3 h, 6 h), el que provoca espectaculares subidas en el contenido en prolina de la hoja, de 15,6 a 258  $\mu\text{mol prolina g}^{-1}$  ps (Fig. 4.9, control, día 10). Al restablecer el riego, los niveles de este osmolito descienden (Fig. 4.9, día 12 tras riego).

En la figura 4.10 se comparan los datos de ensayo combinado con el térmico. Ambos se han sometido a  $T^a$  de 40 °C, pero en el combinado las plantas han sido crecidas en vermiculita con riego restringido (Fig. 4.10, riego restringido) mientras que las llamadas del ensayo térmico han crecido en cultivos hidropónicos sin limitación de agua (Fig. 4.10, cultivos hidropónicos). Los resultados muestran que en ambas condiciones los niveles de prolina acumulados están muy por debajo de los obtenidos en el ensayo de estrés hídrico severo (Fig. 4.9, 10 días) sin embargo a pesar de que se acumula poca prolina se pone en evidencia que el aumento de temperatura (40 °C) en los cultivos

hidropónicos provoca acumulación de prolina en las hojas (Fig. 4.10, hidropónicos 30 min). El proceso es muy rápido ya que en 30 min se detecta una subida de prolina (Fig. 4.10, barras amarillas, 30 min). Sin embargo, se muestra que la diferencia con el control es más importante en los cultivos hidropónicos (4,7 hasta 12  $\mu\text{mol}$  prolina  $\text{g}^{-1}$  ps) (Fig. 4.10, hidropónicos, control, 30 min). Si la planta tiene cierto déficit hídrico la diferencia es más pequeña (15,6 a 20) pero se alcanza mayor cantidad total (Fig. 4.10, estrés hídrico, control, 6 horas). Esta acumulación de prolina descende a los valores iniciales al finalizar el tratamiento de golpe de calor (40 °C), aunque las plantas en estrés hídrico ligero mantienen niveles de prolina más altos debido a que continúan con una cierta restricción hídrica (Fig. 4.10, 24 horas). Estos resultados indican que la disponibilidad hídrica no evita los desequilibrios puntuales producidos por las diferencias de velocidad entre la transpiración y la incorporación de agua por las raíces que pueden producirse por una aumento brusco de la T<sup>a</sup>.

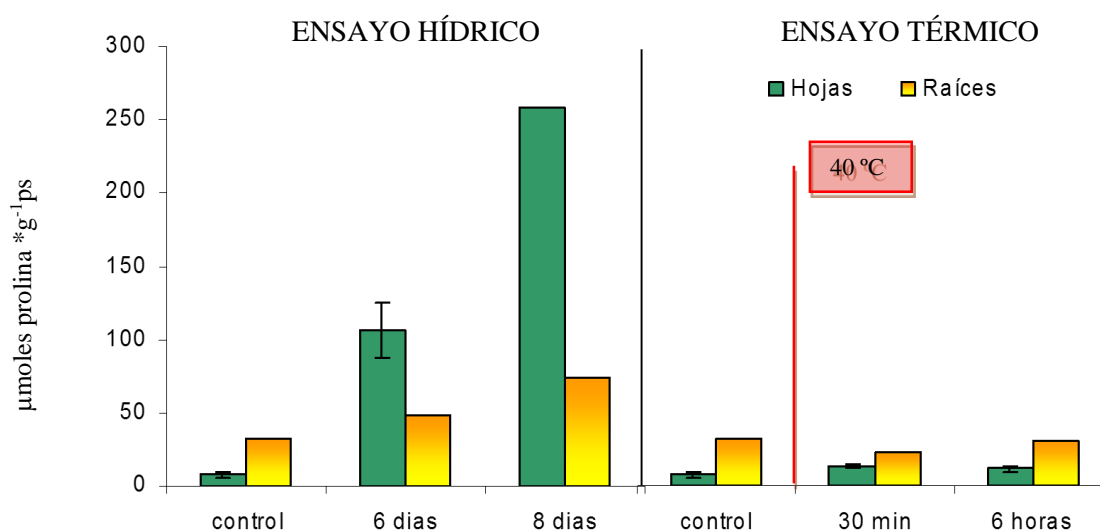


**Figura 4.9.** Prolina acumulada en las hojas en el ensayo combinado (3 días sin riego más aumento de temperatura) e hídrico. En el eje horizontal se muestra el tiempo desde que se establece la condición. El marcador rojo (40 °C) indica el momento en el que se sube la temperatura. El marcador azul (25 °C) muestra el momento en el que se baja de nuevo para ver lo que sucede tras la recuperación. En el ensayo hídrico se indican los días sin riego. El marcador verde (riego) señala el aporte de agua tras el que se produce una caída de prolina y recuperación de la planta.



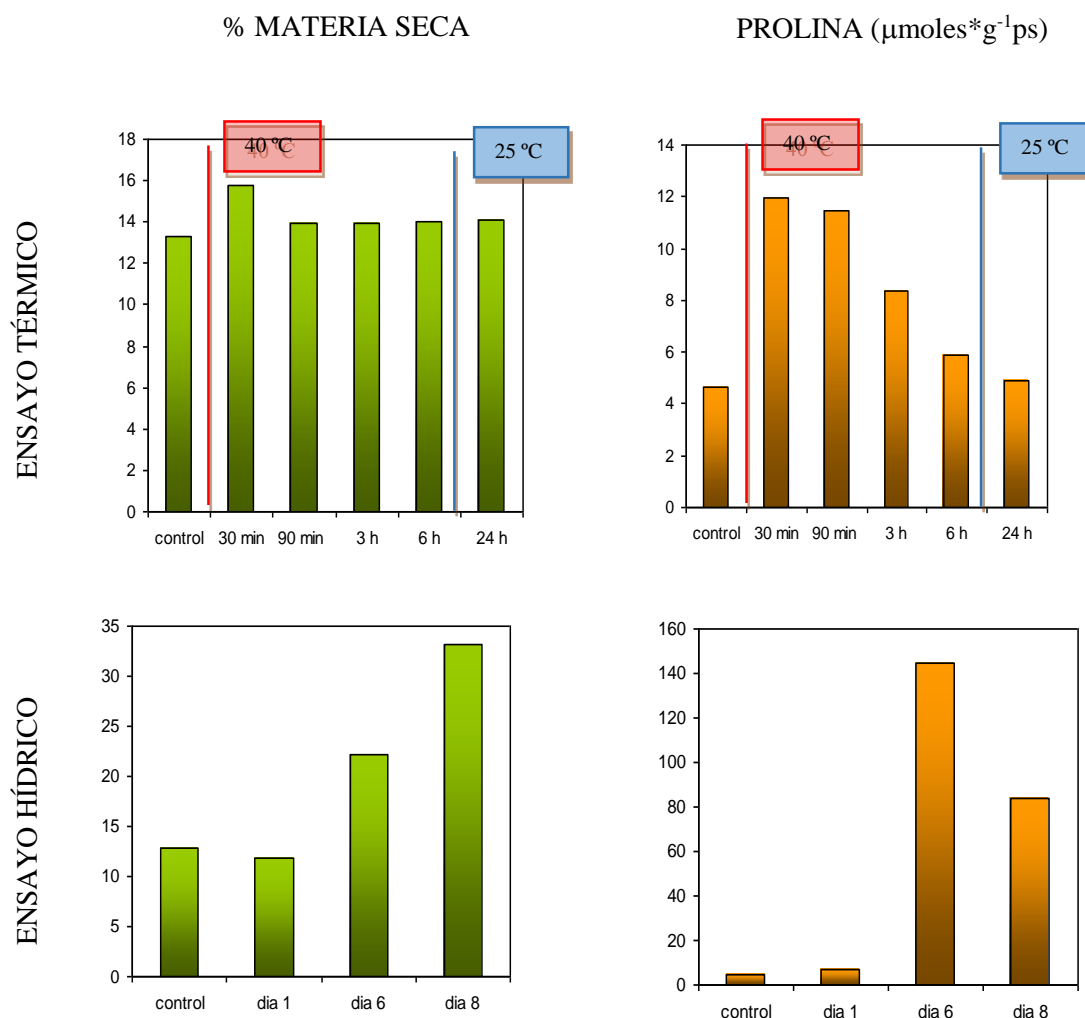
**Figura 4.10.** Prolina en hojas en ensayo combinado (barras naranjas) y térmico (barras amarillas). El eje horizontal muestra el tiempo transcurrido tras el tratamiento. Indicador rojo (40 °C) aumento de la temperatura respecto a las condiciones de crecimiento (25 °C). El indicador azul (25 °C) muestra el restablecimiento de las condiciones iniciales. Barra naranja, estrés hídrico (equivalente a estrés combinado: riego deficitario + alta T<sup>a</sup>). Barra amarilla, hidropónico (equivalente a ensayo térmico: riego a demanda + alta T<sup>a</sup>).

En la figura 4.11 se comparan los niveles de prolina entre hojas y raíces. Los resultados muestran que el ensayo hídrico produce mayores acumulaciones de prolina cualquiera que sea el órgano analizado.



**Figura 4.11.** Prolina en hojas (barras verdes) y raíces (barras amarillas) en ensayo hídrico y térmico. En el ensayo hídrico, el eje horizontal muestra los días sin riego. En el ensayo térmico se muestran el tiempo que la planta está sometida al tratamiento. El indicador rojo (40 °C) muestra el comienzo del tratamiento.

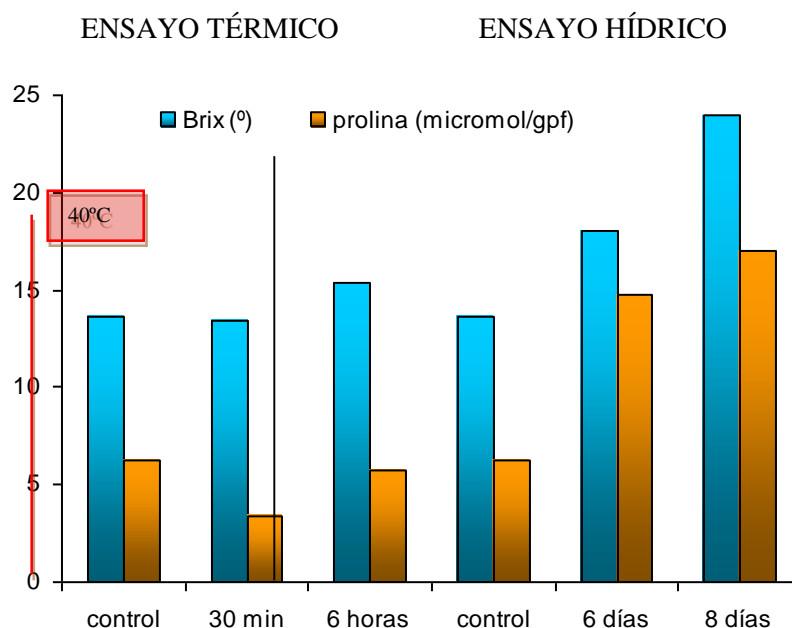
La comparación de los datos de prolina con la materia seca de hojas muestra que tanto en el ensayo térmico (Fig. 4.12, %MSH a 30 min) como en el hídrico (Fig.4.12, %MSH a 6 días) la acumulación de prolina responde a un desequilibrio hídrico a nivel de las hojas mostrado como un aumento de %MSH (% de materia seca de hojas).



**Figura 4.12.** % de materia seca en hojas (barras verdes) y acumulación de prolina (barras naranjas) en hojas en las condiciones de estrés térmico e hídrico. El eje horizontal muestra el tiempo de tratamiento. En el ensayo térmico, los indicadores muestran el comienzo del aumento de temperatura (rojo; 40 °C) y el retorno a las condiciones control (azul; 25 °C).

El brix, un parámetro agronómico que indica cantidad de sustancias en disolución, sigue un comportamiento idéntico a la prolina (Fig. 4.13). Varía poco en el ensayo térmico (Fig. 4.13, control, 30 min, 6 h) e incrementa de forma considerable en el ensayo hídrico (Fig. 4.13, control, 6 y 8 días). Ambos parámetros son buenos índices del estrés hídrico de la raíz y un reflejo de la capacidad de ajuste osmótico de este órgano para enfrentarse a periodos de déficit hídrico.

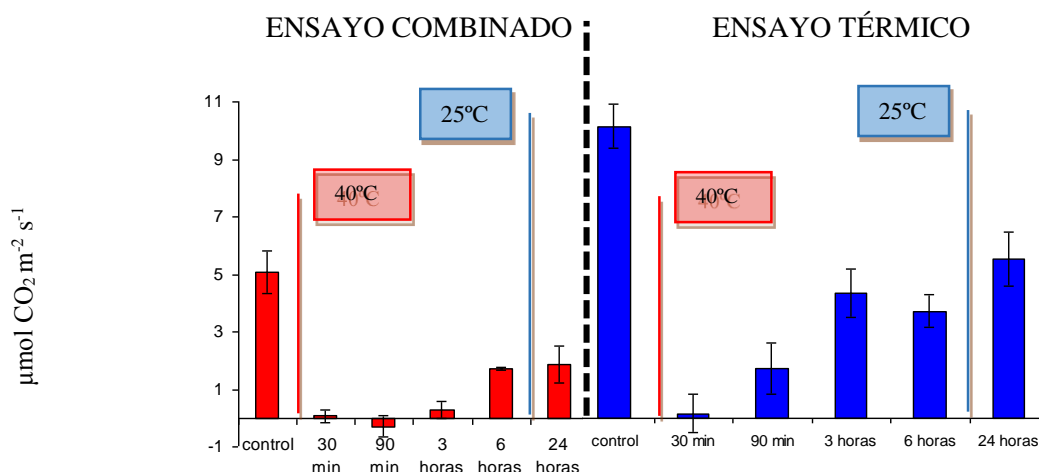




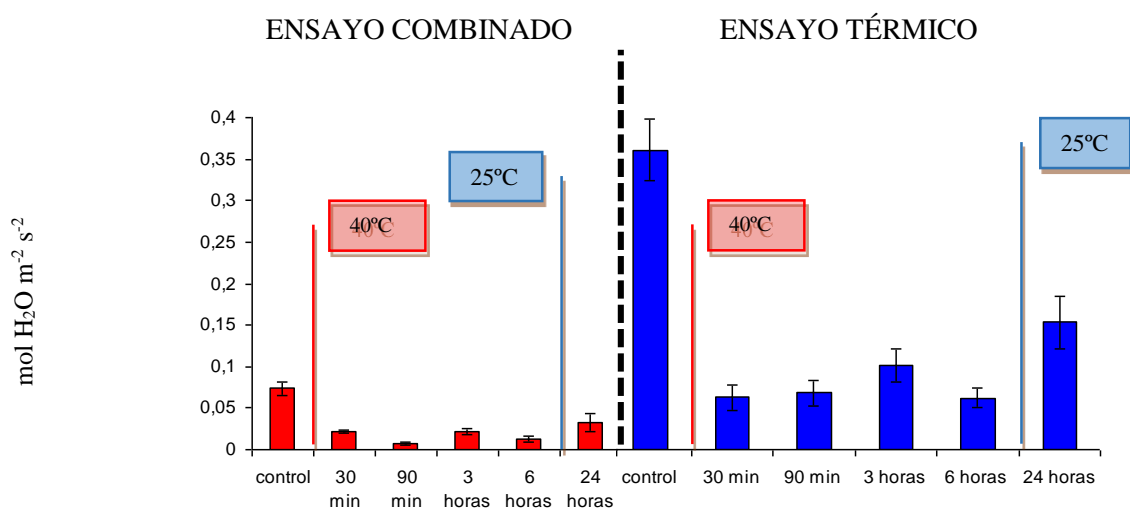
**Figura 4.13.** Comparación de la acumulación de prolina en raíces (barras naranja,  $\mu\text{moles/g}$  peso fresco) y de los grados Brix (Barras azules, °Brix) también de la raíz. El eje horizontal muestra el tiempo de tratamiento. En el caso del ensayo térmico, el tiempo que las plantas estuvieron sometidas a 40 °C (indicador rojo). En el caso del ensayo hídrico, los días sin riego.

Es complejo establecer umbrales absolutos de nivel hídrico a partir del cual se dispara la acumulación de prolina en hojas, ya que los patrones de distribución de prolina en hojas y raíces, así como los contenidos netos alcanzado en cada órgano parecen estar estrechamente relacionados con el historial de riego de la planta y con los procesos de aclimatación.

El estrés hídrico afecta de forma importante a la fotosíntesis y la conductancia (Fig. 4.14 y 4.15, Barras rojas, estrés hídrico; barras azules, control). Este mayor grado de estrés se ve reflejado en la mayor acumulación de prolina en hojas (Fig. 4.11, naranja respecto amarillo). Por tanto el efecto brusco de caída de fotosíntesis y conductancia estomática debido a la temperatura se ve agravado por una situación de estrés hídrico previo que puede tener importantes repercusiones agronómicas.



**Figura 4.14.** Fotosíntesis en el ensayo combinado (barras rojas) y en el ensayo térmico (barras azules). El eje horizontal muestra el tiempo que las plantas estuvieron sometidas al tratamiento. Los indicadores muestran la temperatura aplicada (rojo; 40 °C) y el retorno a las condiciones iniciales (azul; 25 °C). La línea discontinua separa los dos ensayos.



**Figura 4.15.** Conductancia estomática en el ensayo combinado (barras rojas) y en el ensayo térmico (barras azules). El eje horizontal muestra el tiempo que las plantas estuvieron sometidas al tratamiento. Los indicadores muestran la temperatura aplicada (rojo; 40 °C) y el retorno a las condiciones iniciales (azul; 25 °C).

En el cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal un buen perfil hídrico del suelo minimizaría las repercusiones de los golpes de calor.

### 3.4.5. Análisis de las correlaciones que presenta la prolina con el resto de parámetros estudiados

Se realizó un análisis de Pearson para buscar las correlaciones más significativas de la prolina con otros parámetros a nivel global. Se han seleccionados aquellas correlaciones importantes:  $n \geq 4$ ,  $|r| > 0,5$  y significación  $< 0,05$ .

En la tabla 4.5 se muestra que a nivel de las tres campañas y todos los ensayos realizados en su conjunto (túnel, ensayo hídrico, golpes de calor en microtúneles), la prolina de la raíz muestra interesantes correlaciones: con el nitrógeno alfa amino, con los azúcares reductores (fructosa y glucosa). No sólo la prolina se acumula como osmolito en las raíces en situaciones de estrés, también aminoácidos, razón por la que ambos parámetros están correlacionados. En el caso de los de azúcares reductores, las situaciones de estrés demandan un gasto energético que en el caso de la raíz genera la movilización de las reservas de sacarosa.

Además muestra correlaciones directas con el porcentaje de materia seca de los diferentes órganos de la planta (peciolo, hojas y raíz) y con el sodio. Esto remarca nuevamente, como la prolina es una respuesta al déficit hídrico. El número de hojas por planta, el LAI y la superficie foliar específica se correlacionan de forma inversa con la prolina. La disminución de la cobertura es un mecanismo bien conocido de las plantas para tolerar situaciones de sequía. En condiciones de déficit hídrico las plantas de remolacha disminuyen su área foliar y acumulan osmolitos compatibles, como la prolina en la raíz.

**Tabla 4.5.** Correlaciones entre prolina y los parámetros agronómicos durante las tres campañas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. AAmino: nitrógeno alfa-amino, AzRed: azúcares reductores, %MSP: porcentaje de materia seca de peciolo, %MSH: porcentaje de materia seca de hoja, %MSL: porcentaje de materia seca de limbo, LAI: índice de área foliar, SFE MS: superficie foliar específica por masa seca. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones mostradas tienen una significación  $< 10^{-5}$ . Se muestra en negrita aquellas correlaciones con  $\text{sign.} < 10^{-14}$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P.(r)	N
<b>AAmino</b>	<b>Prolina- raíz-Ugpf</b>	<b>0,671</b>	<b>104</b>
AzRed	Prolina- raíz-Ugpf	0,502	104
Hojas/Planta	Prolina- raíz-Ugpf	-0,509	96
%MSP	Prolina- raíz-Ugpf	0,525	93
%MSH	Prolina- raíz-Ugpf	0,536	92
%MSL	Prolina- raíz-Ugpf	0,521	92
Sodio	Prolina- hoja-Ugpf	0,512	79
LAI	Prolina- raíz-Ugpf	-0,588	76
SFE MS	Prolina- raíz-Ugpf	-0,531	76

### 3.5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC)

---

La fosfoenolpiruvato carboxilasa es una enzima carboxiladora, ubicua, con gran variedad de funciones en las plantas. Esta enzima juega un papel fundamental suministrando esqueletos carbonados al ciclo de Krebs para la síntesis de aminoácidos (función anaplerótica) desplazando el equilibrio C/N hacia el N. Esta es su función fundamental en los órganos heterótrofos como es el caso de las raíces (González et al. 1998; Echevarría & Vidal 2003).

En estudios anteriores en nuestro laboratorio, se determinó la actividad PEPC de la raíz de la remolacha azucarera en diferentes condiciones de manejo del cultivo. Pero no se había abordado el estudio de los mecanismos de regulación de la PEPC en esta raíz. Con frecuencia, los parámetros evaluados en esta enzima son la actividad específica y los niveles de fosforilación. El estado de fosforilación de la enzima se mide a través de la determinación de su sensibilidad a su efector negativo, el L-malato. La PEPC es una enzima fuertemente regulada por fosforilación reversible y esta fosforilación desensibiliza a la enzima frente a este efector negativo (Chollet et al. 1996). La concentración de L-malato a la cual la enzima es inhibida al 50% (IC50) es el parámetro comúnmente utilizado para determinar el estado de fosforilación (Chollet et al. 1996). La dificultad de calcular la IC50 en algunos tejidos y órganos C<sub>3</sub> ha llevado a diseñar otros ensayos para evaluar el grado de fosforilación de la enzima. En concreto, la relación de la actividad de la enzima entre el pH óptimo de 8 y la actividad a los pHs subóptimo de 7,3 y 7,1 han puesto en evidencia que dicha relación disminuye cuando la enzima se encuentra más fosforilada (Echevarría & Vidal 2003). Así mismo se ha visto un aumento de la afinidad de la enzima por su efector positivo, la glucosa-6P, cuando la enzima está fosforilada (Echevarría & Vidal 2003). En este trabajo se ha determinado la actividad de la enzima a distintos pHs (7,1; 7,3 y 8) y la activación que se produce a estos mismos pHs en presencia de glucosa-6P para profundizar en la caracterización de esta enzima en la raíz de *Beta vulgaris* además de para correlacionar posibles patrones de respuesta a estrés con la actividad y el estado de fosforilación de esta enzima.

Todos estos estudios se realizaron durante las campañas agrícolas de 2004 a 2006. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada campaña agrícola y finalmente se hará un análisis conjunto de las tres campañas.

### 3.5.1. Campaña agrícola 2003-2004 (1ª campaña)

---

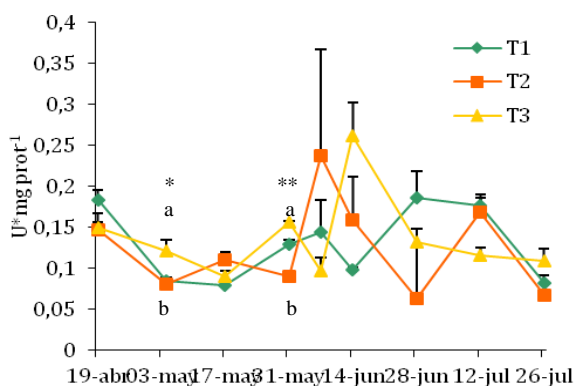
#### 3.5.1.1. Evolución de la actividad PEPC durante la 1ª campaña

Los valores de **actividad específica** y **actividad total** a pH 8 de la PEPC son bajos comparados con los valores obtenidos en otras campañas (Jiménez 2004). La actividad específica se mantiene entre 0,1 y 0,27 U/mg prot. (Fig. 5.1 y 5.2), valores comparables a los de la variedad Monatunno, variedad de baja actividad PEPC, de campañas anteriores (Jiménez 2004). La actividad total permanece entre 0,05 y 0,35 U/gpf. En campañas anteriores se mantuvo entre 0,2 y 0,4 U/gpf, siendo los mínimos que se muestran hasta 4 veces menores que los mínimos de anteriores campañas.

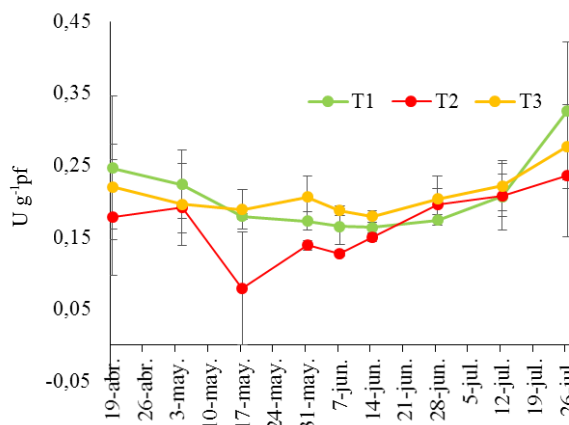
El perfil de la **actividad específica** presenta dos zonas: los muestreos hasta el 1 de mayo, con una actividad baja y con pocas fluctuaciones, y a partir de ese muestreo, las tres condiciones comienzan a presentar mayor dispersión. Las plantas del control aumentan su actividad llegando a un máximo de 0,2 el 28 de junio y descendiendo a su mínimo en el último muestreo del 26 de julio. Los tratamientos bajo plástico presentan sus máximos en los muestreos de principio y mitad de junio, antes que el control, descendiendo igual que este en el último muestreo. Se observa diferencia significativa entre los tratamientos en el segundo y en el cuarto muestreo, presentando T3 los valores más altos y T2 los más bajos.

La **actividad total** muestra para los tres tratamientos un perfil descendente hasta el muestreo del 7 de junio (exceptuando el pico de gran variabilidad para T2 del tercer muestreo) y a partir de esa fecha comienza a aumentar para alcanzar los máximos de las tres condiciones en el último muestreo. Aunque T2 muestra valores más bajos en todos los muestreos en actividad total, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el comportamiento de las tres condiciones.

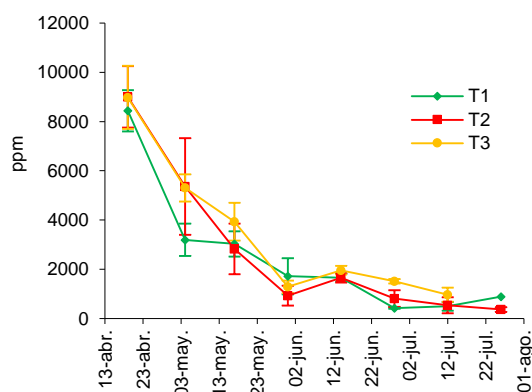
En cuanto a la actividad específica, el pico de producción de N- $\alpha$ -amino del muestreo del 28 de junio para T2 (Fig.5.4) coincide con una caída de la actividad PEPC precisamente en esa fecha y en ese tratamiento (T2). En las gráficas (Fig. 5.5 y 5.6) puede observarse que los dos días previos a ese evento, se produjo en el tratamiento 2 una combinación de altísima temperatura y baja humedad relativa que pudiera estar en la base de una disminución puntual de actividad PEPC de T2 y acumulación de N- $\alpha$ -amino.



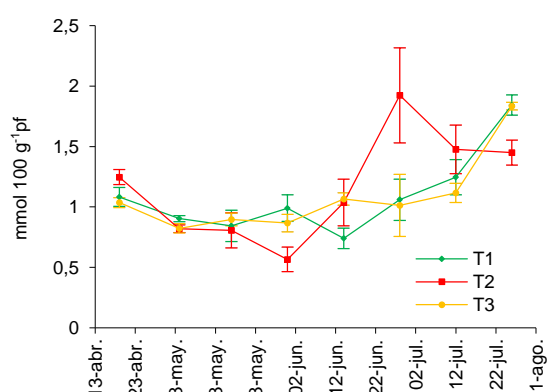
**Figura 5.1.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad específica de la PEPC medida a pH 8. (—◆—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



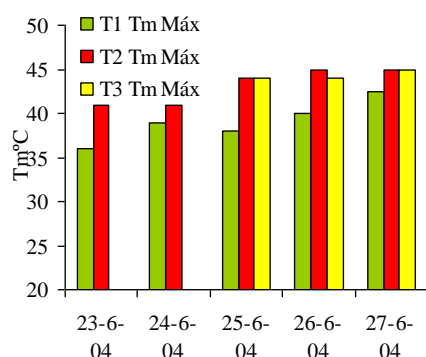
**Figura 5.2.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad total de la PEPC medida a pH 8. (—●—) Control; (—●—) T2; (—●—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



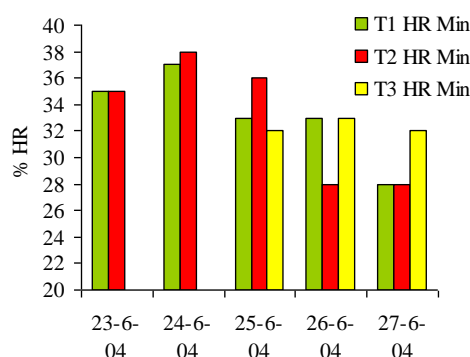
**Figura 5.3.** Contenido en  $\text{NO}_3$  en jugo de peciolo en las tres condiciones de manejo. (—◆—) Control; (—■—) T2; (—●—) T3. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Datos facilitados por AIMCRA.



**Figura 5.4.** Contenido en N- $\alpha$ -amino en raíz en las tres condiciones de manejo. (—◆—) Control; (—■—) T2; (—●—) T3. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Datos facilitados por AIMCRA.



**Figura 5.5.** Temperaturas máximas previas al 6º muestreo (28 de junio) en las tres condiciones.

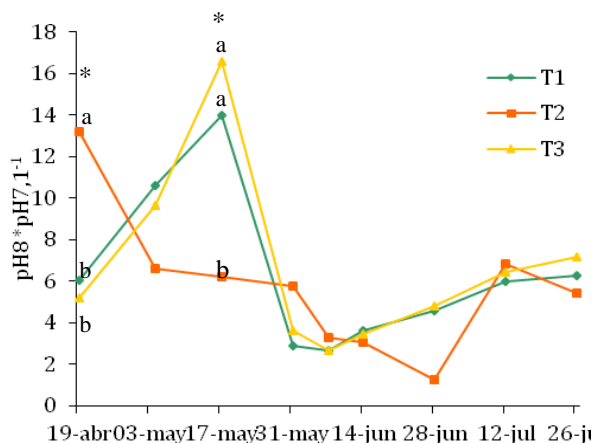


**Figura 5.6.** Valores de humedad relativa mínima previos al 6º muestreo (28 de junio) en las tres condiciones.

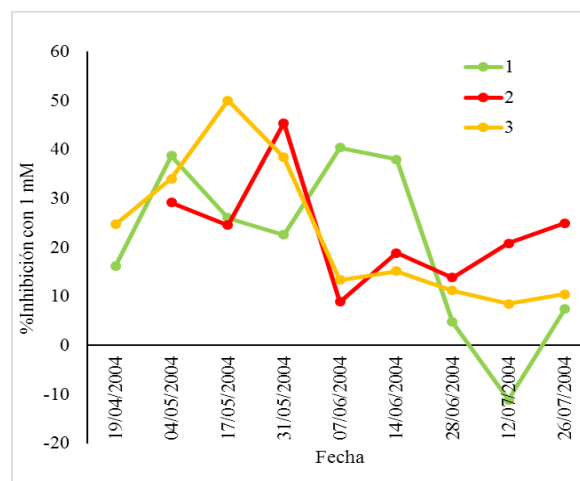
**3.5.1.2. Niveles de activación de la PEPC durante la 1ª campaña**

Para evaluar la posible relación entre los diferentes tratamientos de calor y el grado de fosforilación de la enzima, se calculó la relación de la Actividad PEPC determinada a pH 8/Actividad PEPC determinada a pH 7,1 (relación pH8/pH7,1 en adelante), el % de inhibición en presencia de L-malato y la activación de la PEPC por su efector positivo, la glu6-P a los diferentes pHs estudiados. Como se comentó al inicio, estos parámetros se utilizan para medir el grado de activación de la PEPC por fosforilación. Se ha descrito que valores altos en la relación pH 8/7,1, en la inhibición con málico y en la activación con glucosa 6P implican menor grado de fosforilación de la enzima (Echevarría et al. 1994).

En la **relación pH 8/7,1** mostrada en la figura 5.7, se observan diferencias significativas entre los tratamientos. T2 presenta bajos niveles de fosforilación en el primer muestreo. En este muestreo hay diferencia significativa entre T2 y las otras dos condiciones. Es en el segundo y tercer muestreo donde el control y T3 muestran menor fosforilación. T2 mantiene niveles bajos con diferencias estadísticamente significativas entre T2 y los otros tratamientos en el 3º muestreo (17 de mayo). A partir del 31 de mayo los valores estudiados bajan indicando un aumento de la fosforilación de la enzima en ese periodo. Estos resultados se ven confirmados con las determinaciones de la sensibilidad al L-malato de la PEPC, mostrados en la figura 5.8 donde en general, los valores de PEPC caen en los últimos muestreos indicando una enzima más fosforilada. Las raíces de las remolachas control presentan los mínimos de inhibición en los tres últimos muestreos. En el control el perfil es similar al de las remolachas bajo los túneles pero con los máximos y los mínimos alcanzados retrasados respecto a los tratamientos.



**Figura 5.7.** Relación entre la actividad PEPC medida a pH8 y medida a pH7,1 en cada una de las fechas muestreadas para las tres condiciones de manejo. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



**Figura 5.8.** % de inhibición de la actividad PEPC medida a pH 7,3 en presencia de 1 mM de L-malato para las fechas muestreadas y las tres condiciones de manejo. (—●—) 1; (—●—) 2; (—●—) 3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

Los resultados obtenidos con la activación de la G6P van en el sentido de los obtenidos con la relación pH8/pH7,1 y con la sensibilidad al malato, y muestran mayores valores de activación a pH 7,1 y 7,3 en los meses de mayo, para caer en los meses de junio y julio. Menores valores de activación indican una enzima con mayor grado de fosforilación (Fig. 5.9). A pH 8 no se detecta activación de acuerdo con lo establecido en trabajos anteriores donde se muestra que una activación diferencial de la PEPC por G6P en relación al estado de fosforilación de la enzima solo se detecta a los pHs subóptimos de 7,1 y 7,3 y no a pH óptimo de 8 (Echevarría & Vidal 2003).

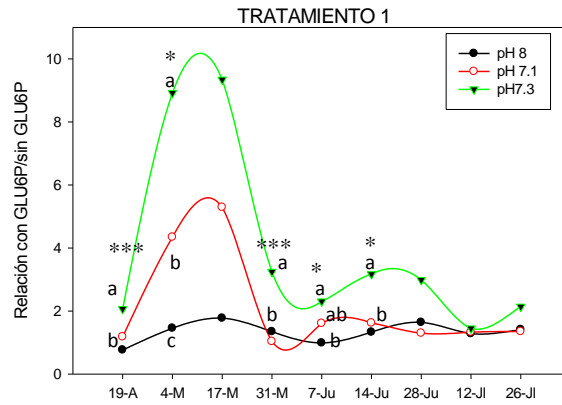
Respecto a la diferencia entre los tratamientos es el tratamiento sin ventilación, T2 (tratamiento de mayor temperatura) el que muestra menores valores de activación (Fig. 5.B) por lo tanto, mayor fosforilación de la PEPC. En la gráfica de actividad total (Fig. 5.2) puede observarse que la actividad de la PEPC en los cuatro primeros muestreos se mantiene más baja y estable que para la segunda parte de los muestreos, a partir del 31 de mayo. Esa es la fecha en la que cambia también la activación y la fosforilación. Estos datos parecen mostrar dos momentos para la enzima:

- El mes de mayo, con bajos valores de actividad PEPC en todos los tratamientos y menores niveles de fosforilación y
- A partir del 31 de mayo: La actividad aumenta en los tres tratamientos, también la variabilidad y la enzima muestra un mayor nivel de fosforilación.

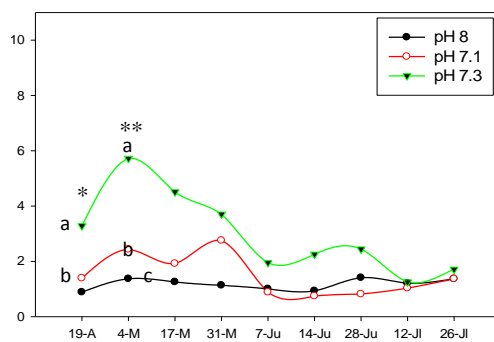
Cabría destacar la mayor fosforilación mantenida a lo largo del ensayo en el tratamiento T2, que es el que mayor temperatura recibió.



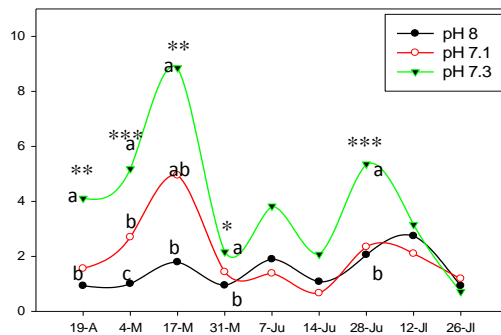
En las condiciones de esta campaña parece que un mayor estrés en la planta (condiciones de junio-julio para todo el cultivo y condiciones de T2) va acompañado de un mayor estado de fosforilación en la PEPC de la raíz.



A) Control (T1)



B) Sin ventilación (T2)



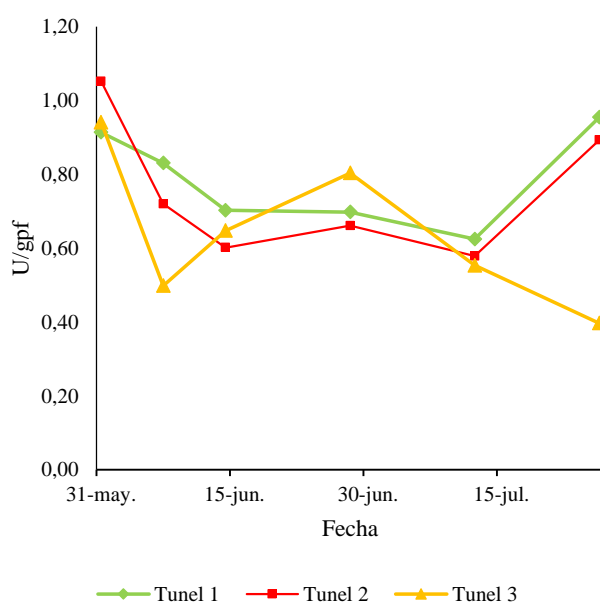
C) Ventilado (T3)

**Figura 5.9.** Evolución a lo largo de los muestreos de la activación de la PEPC en presencia de Glucosa-6-P a concentraciones saturantes (4 mM) y a distintos pHs, (actividad con G-6-P/actividad sin G-6-P). A) Control; B) T2; C) T3. (●) pH 8; (▼) pH 7,3; (○) pH 7,1. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

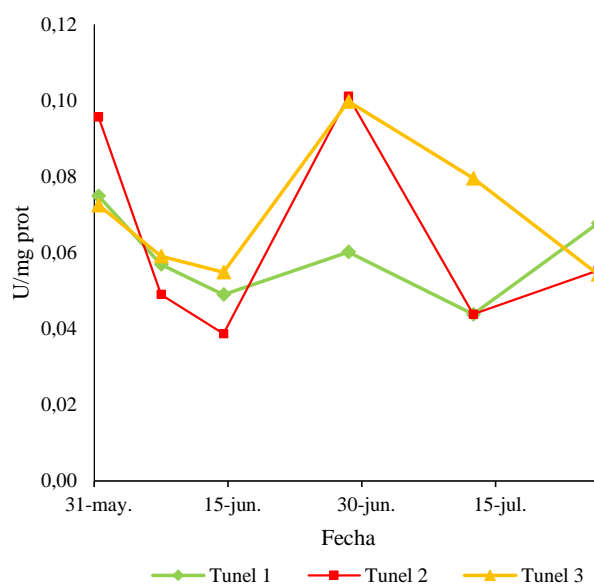
### 3.5.1.3. Medidas de la PEPC en hojas durante la primera campaña

Durante esta primera campaña también se midió la actividad PEPC en las hojas. La actividad fue medida a pH8 ya que a pH7,3 y 7,1 no se detectaba actividad. Solo se analizaron las muestras a partir de mayo que es cuando la planta empieza la fase de acumulación de azúcar.

El perfil de la actividad en hojas es en cierta forma opuesto a la actividad en la raíz. En cuanto a la actividad total, en raíces no hay diferencia entre los tratamientos y tiene un perfil ligeramente ascendente hacia las fechas de recolección. La actividad específica permanecía baja en los primeros muestreos subiendo en los muestreos de final de mayo principio de junio, que es precisamente cuando desciende la actividad específica en las hojas. Cabe destacar los rangos en comparación con la raíz. En la medida de actividad específica, la raíz presenta valores entre 1,75 (mínimos) y 2,5 (máximos) veces más altos que en las hojas. En actividad total es la hoja la que se sitúa por encima con valores entre 5,7 (mínimos) y 3,7 (máximos) veces más altos que en la raíz.



**Figura 5.10.** Actividad total en hojas de remolacha a partir del 4º muestreo medida a pH 8. (-♦-) Control; (-■-) T2; (-▲-) T3. Con la colaboración de J. Gandullo y R. Álvarez.



**Figura 5.11.** Actividad específica en hojas de remolacha a partir del 4º muestreo medida a pH 8. (◆) Control; (■) T2; (▲) T3.

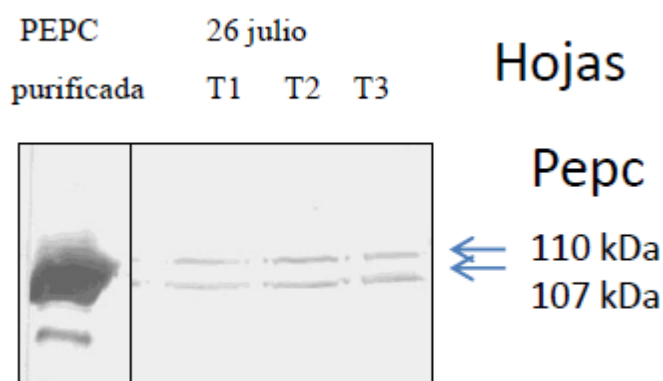
#### 3.5.1.4. Patrones de monoubiquitinación de la PEPC en hojas y raíces durante la 1ª campaña

Recientemente se ha puesto en evidencia que la PEPC además de regularse por fosforilación, sufre otra modificación postraducciona por monoubiquitinación que por el momento es inhibidora cuando se analiza la enzima purificada de semillas de sorgo (Ruiz-Ballesta et al. 2014), pero que tiene un efecto contrario cuando la actividad de la enzima monoubiquitinada se determina en extractos crudos de semilla (datos no publicados). Pocos son los estudios que por el momento se han hecho acerca de la monoubiquitinación de la PEPC por lo que nos pareció de interés ver los patrones de monoubiquitinación en la hoja y raíz de remolacha. La monoubiquitinación de la PEPC se detecta en Western blot. Con esta técnica, se revelan dos bandas de PEPC de 110 y 107 kDa que indican la forma monoubiquitinada y desubiquitinada, respectivamente, de la enzima. La figura 5.12 muestra el Western blot de hojas del último muestro mostrando una PEPC monoubiquitinada en el control y en todos los tratamientos con una proporción similar de enzima ubiquitinada y desubiquitinada, indicando que los tratamientos con el túnel no afectaron ni en cantidad ni en proporción a la monoubiquitinación de la PEPC de hojas.

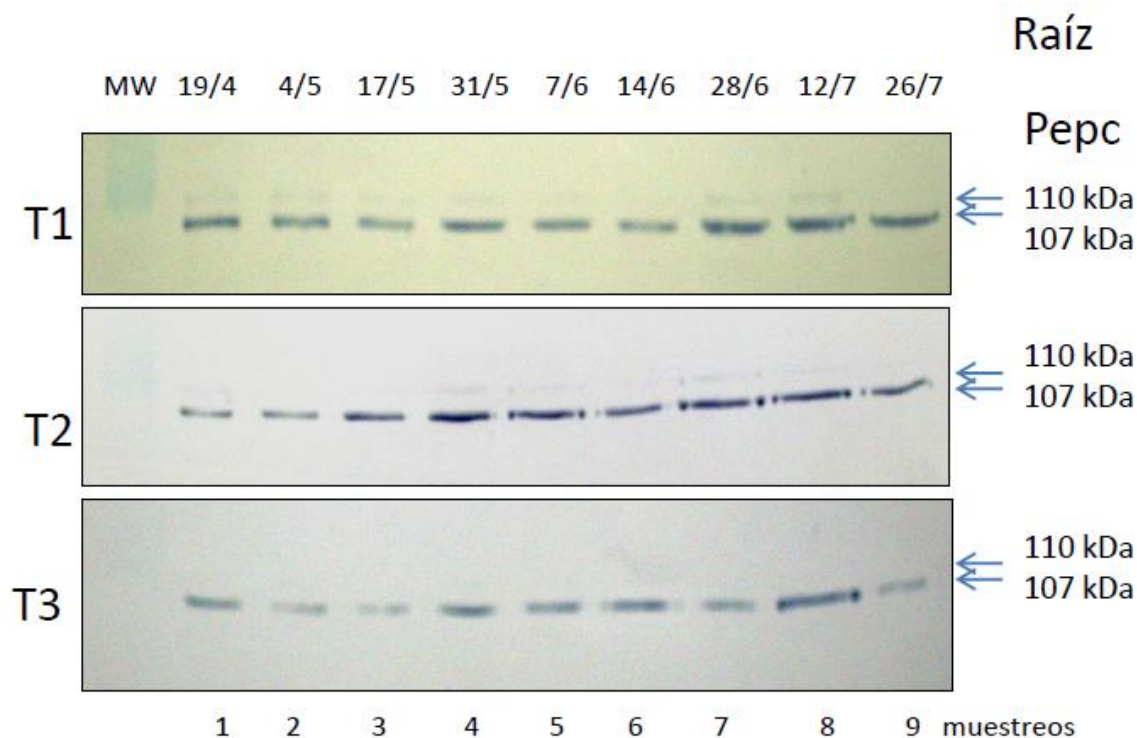
En las raíces se analizaron todos los muestreos (Fig. 6.13) y se aprecia: i) que el patrón es prácticamente equivalente en todos los muestreos, ii) que los niveles de monoubiquitinación de la PEPC, aunque la banda 110 kDa está presente, son muy bajos y iii) que no existen diferencias entre los tratamientos.

En su conjunto los resultados muestran una baja monoubiquitinación de la PEPC en la raíz a lo largo de toda esta campaña y una alta monoubiquitinación de la PEPC de hojas

independientemente de los tratamientos. Estos son los primeros resultados que muestran los patrones de monoubiquitinación de la remolacha azucarera.



**Figura 5.12.** Western blot de hojas de la campaña 2003/2004 en las tres condiciones en el ensayo con túneles. T1, Control; T2, túnel sin ventilación; T3, túnel ventilado. En la parte superior de la figura se indican las fechas de los muestreos. Para las hojas se cargaron 47  $\mu$ g por pocillo. La proteína se reveló con anticuerpos antiPEPC.



**Figura 5.13.** Western blot de raíces de la campaña 2003/2004 en las tres condiciones en el ensayo con túneles. T1, Control; T2, túnel sin ventilación; T3, túnel ventilado. En la parte superior de la figura se indican las fechas de los muestreos. Para las raíces se cargó 0,1 U por pocillo. La proteína se reveló con anticuerpos antiPEPC.

### **3.5.1.5. Correlaciones de la actividad PEPC con el resto de parámetros estudiados durante la 1ª campaña**

Para establecer correlaciones de interés entre la actividad PEPC y el resto de parámetros estudiados se realizó un análisis de correlación de Pearson. Se han seleccionado aquellas correlaciones importantes que presentan un tamaño de muestra,  $n > 4$ ,  $|r| > 0,5$  y  $p < 0,05$ .

En primer lugar se analizarán las correlaciones de la actividad PEPC a los distintos pHs ensayados, con los parámetros agronómicos, ambientales y metabólicos que se muestran en la tabla 5.1. La actividad total a pH 8 es la que muestra mayor número de correlaciones. Es muy llamativo la gran diversidad de correlaciones que presenta esta actividad enzimática en la primera campaña con diversos factores relacionados con el crecimiento, la aclimatación y el metabolismo de la raíz.

El análisis de las correlaciones inversas con los parámetros climáticos, nos indica que **la actividad PEPC disminuye**:

- Cuando aumenta la temperatura máxima, mínima y media (filas 1-4).
- Cuando aumenta la integral térmica (GDIA), y por lo tanto al avanzar el estado fenológico del cultivo (filas 5-8).
- Al aumentar la evapotranspiración potencial (ET<sub>o</sub>, filas 9-12).

Este conjunto de correlaciones indican que la actividad PEPC disminuye hacia los momentos finales del cultivo, con atmósfera más seca, mayor T<sup>a</sup> y menor contenido hídrico. .

Las correlaciones con los parámetros agronómicos indica que la actividad PEPC disminuye

- Cuando aumenta la producción de raíz y de planta. Al ir creciendo la raíz acumuladora la actividad PEPC a pH 8 disminuye (filas 15-19).
- Cuando aumenta la polarización, los azúcares reductores, el brix, y el % de materia seca de los diferentes órganos (filas 25-27 y 22-24).

Estas correlaciones refuerzan en primer lugar lo observado en las correlaciones climáticas: la actividad PEPC disminuye al avanzar la edad del cultivo. La polarización tiene una estrecha correlación con el estado fenológico de la planta (GDIA), que acumula mayor porcentaje de azúcar al acercarse el verano. En segundo lugar, indica que las condiciones de presión ambiental disminuyen la actividad PEPC. Los azúcares reductores, el brix y el % de materia seca aumentan al llegar el verano por efecto de las altas T<sup>a</sup>, ambiente seco y , acumulación de solutos compatibles. Durante el periodo de acumulación de la raíz o en situaciones que desencadenen el estrés hídrico de la planta, la actividad total de la PEPC disminuye.

**Tabla 5.1.** Correlaciones entre la actividad PEPC (total y específica medida a pH 8, pH 7,3, pH 7,1) y los parámetros climáticos y agronómicos durante la primera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del ensayo térmico. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes.

VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
<b>1 TMIN</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,863*****</b>	<b>24</b>
<b>2 TMAX</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,827*****</b>	<b>24</b>
<b>3 TMEDIA</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,826*****</b>	<b>24</b>
4 TMAX	PEPC-pH7,3-Ugpf	-0,500*	24
5 GDÍA6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,813*****	24
6 GDÍA2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,799*****	24
7 GDÍA4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,790*****	24
8 GDÍA	PEPC-pH8-U/gpf	-0,788*****	24
9 EToC4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,797*****	24
10 EToC	PEPC-pH8-U/gpf	-0,784*****	24
11 EToC6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,760*****	24
12 EToC2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,737*****	24
13 HRMIN	PEPC-pH8-U/gpf	0,733*	8
14 HRMEDIA	PEPC-pH8-U/gpf	0,701***	24
<b>15 ProdR</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,823*****</b>	<b>24</b>
16 ProdPI	PEPC-pH8-U/gpf	-0,581**	24
17 ProdMSR	PEPC-pH8-U/gpf	-0,802*****	24
18 ProdMSPI	PEPC-pH8-U/gpf	-0,787*****	23
19 ProdMSL	PEPC-pH8-U/gpf	0,509*	23
20 LAI	PEPC-pH8-U/gpf	0,585**	23
21 ProdH	PEPC-pH8-U/gpf	0,510*	24
22 %MSP	PEPC-pH8-U/gpf	-0,620**	23
23 %MSL	PEPC-pH8-U/gpf	-0,509*	23
24 %MSH	PEPC-pH8-U/gpf	-0,564**	23
25 Polarización	PEPC-pH8-U/gpf	-0,608**	24
26 Az Reductores	PEPC-pH7,3-U/mgprot	-0,560**	24
27 BRIX	PEPC-pH8-U/gpf	-0,505*	24
28 NNMSP	PEPC-pH8-U/gpf	0,713***	20
<b>29 NNJUP</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>0,900*****</b>	<b>23</b>
30 NTR	PEPC-pH8-U/gpf	0,757*****	21
31 Proteína Ugpf	PEPC-pH8-U/gpf	0,770*****	27
32 Sodio	PEPC-pH8-U/gpf	0,775*****	24
33 Potasio	PEPC-pH8-U/gpf	0,793*****	24
<b>34 Glucosa-Ugpf</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>0,808*****</b>	<b>27</b>
35 IA-Umgprot	PEPC-pH7,3-U/mgprot	0,509**	27
<b>36 SS-Ugpf</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>0,827*****</b>	<b>27</b>

En la tabla 5.1 también se muestra el análisis de las correlaciones directas que nos indican los parámetros que varían en el mismo sentido que la actividad PEPC. Así, la **actividad PEPC aumenta:**

- Cuando es mayor la humedad relativa mínima y media (filas 13 y 14)
- Cuando hay una mayor producción de hojas, LAI y limbos (filas 19, 20, 21).
- Cuando hay una mayor cantidad de nutrientes nitrogenados circulando por la planta, tanto nitrógeno (N total (fila 30), N en masa seca de planta (fila 28), N en jugo de peciolo (fila 29) como  $\text{Na}^+$  (fila 32) y  $\text{K}^+$  (fila 33), además de mayor cantidad de proteínas (fila 31).
- Cuando hay mayor cantidad de fotoasimilados (glucosa, fila 34) y una mayor actividad metabólica de crecimiento en la raíz, como indican las altas correlaciones con la invertasa ácida (fila 35) y sobre todo con la SS (fila 36).

Este conjunto de resultados indica que la actividad PEPC durante esta primera campaña, es mayor en las situaciones de crecimiento activo de la planta. La actividad de la PEPC de la raíz estaría conectada con el crecimiento de la parte vegetativa, el flujo de fotoasimilados y nutrientes nitrogenados y el crecimiento de la raíz (relación con SS e invertasa). Estas correlaciones serían un ejemplo de la función anaplerótica de la PEPC en la raíz de remolacha y su papel clave en el metabolismo del C y del N, sobre todo en las situaciones de crecimiento de la planta.

#### ***3.5.1.6. Correlaciones entre los parámetros indicadores de la regulación de la PEPC por fosforilación durante la 1ª campaña***

También se realizó un análisis de correlaciones para los distintos parámetros utilizados para medir el grado de fosforilación de la PEPC. Las correlaciones más importantes encontradas se muestran en la tabla 5.2.

Las correlaciones entre los parámetros que determinan el nivel de fosforilación son contundentes. Existe una importante correlación inversa entre la relación  $\text{pH}8/7,1$  y  $7,3$  y la actividad en presencia de distintas concentraciones de málico, como se muestra entre las filas 1-18 (PEPC-2mM –U/mg prot sería la actividad específica de la PEPC medida en presencia de 2 mM de málico). Un mayor ratio  $\text{pH}8/\text{pH}s$  subóptimos implica menor actividad PEPC en presencia de distintas concentraciones de málico. Estas correlaciones muestran coeficientes de Pearson muy elevados, en valor absoluto, de hasta -0,96. Son las concentraciones de málico entre 0,5 mM y 3 mM las que mayores valores de  $r$  (mejor ajuste lineal) presentan. Estos datos muestran que a pesar de la dispersión de los datos representados en las gráficas, ambos parámetros van en el mismo sentido e indican la presencia de una PEPC desfosforilada.

Las filas 19, 20 y 21 muestran las correlaciones entre este ratio y la activación por glucosa-6P a  $\text{pH}7,3$  y  $\text{pH}7,1$ . Las correlaciones son positivas, indicando que mayores valores de la relación entre  $\text{pH}s$  también muestran mayores valores de activación en presencia de glucosa-6P.

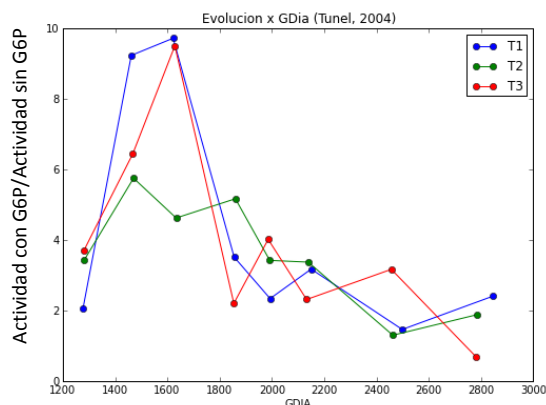


Estos datos muestran que durante esta primera campaña los tres parámetros utilizados para medir el grado de fosforilación de la PEPC de raíz concuerdan con lo descrito para la PEPC fotosintéticas: mayores valores de la relación pH8/pHs subóptimos implican mayores valores de activación en presencia del efector positivo y mayor inhibición en presencia del efector negativo. Estos valores en la bibliografía, correspondería con una enzima desfosforilada (Chollet et al. 1996).

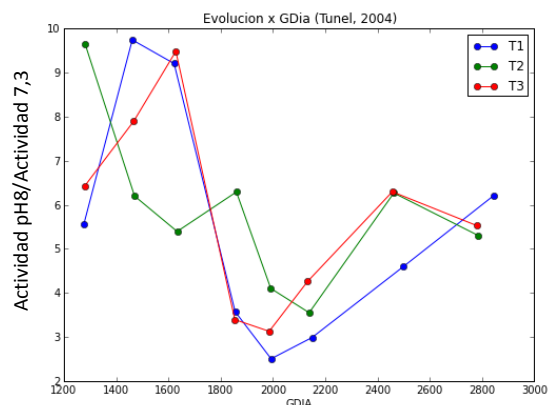
**Tabla 5.2.** Correlaciones entre la tasa pH8/pH 7,3 y pH8/pH 7,1 con el resto de parámetros medidos para determinar el estado de fosforilación de la PEPC durante la primera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del ensayo térmico. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes.

	VARIABLE 1	VARIABLE 2	CP (r)	N
1	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-2mM-U/mgprot	-0,960***	7
2	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-3mM-Ugpf	-0,944**	6
3	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-3mM-Ugpf	-0,906*	6
4	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-2mM-U/mgprot	-0,899**	7
5	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-3mM-U/mgprot	-0,856*	6
6	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-1,5mM-U/mgprot	-0,845**	11
<b>7</b>	<b>PEPC-pH8/pH7,3</b>	<b>PEPC-0,5mM-U/mgprot</b>	<b>-0,833****</b>	<b>17</b>
8	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-2mM-Ugpf	-0,804*	7
9	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-0,2mM-Ugpf	-0,780***	17
<b>10</b>	<b>PEPC-pH8/pH7,3</b>	<b>PEPC-1mM-U/mgprot</b>	<b>-0,762****</b>	<b>26</b>
11	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC- 0,2mM-Ugpf	-0,749***	17
12	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC- 0,2mM-Umgprot	-0,738***	17
13	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC- 0,2mM-Umgprot	-0,675**	17
14	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-0,5mM-U/mgprot	-0,644**	17
15	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-0,5mM-U/gpf	-0,5687*	17
16	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-1mM-U/mgprot	-0,561**	26
17	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-1mM-U/gpf	-0,555**	26
18	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-0,5mM-U/gpf	-0,554*	17
19	PEPC-pH8/pH7,1	PEPC-1mM-U/gpf	-0,518**	26
20	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC- pH7,3-ActivacionG6P	0,623***	27
21	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC- pH7,1-ActivacionG6P	0,633***	27

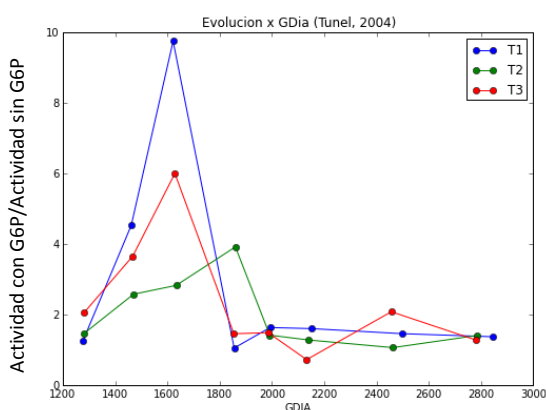
Cuando se representan los parámetros del grado de fosforilación en función del grado de desarrollo de la planta (Integral térmica, GDIA) esta correlación se hace evidente. Los valores de activación son más altos coincidiendo con mayores valores en la relación pH8/pH 7,3 (Fig. 5.14, A y B) y lo mismo para las determinaciones a pH subóptimo de 7,1.



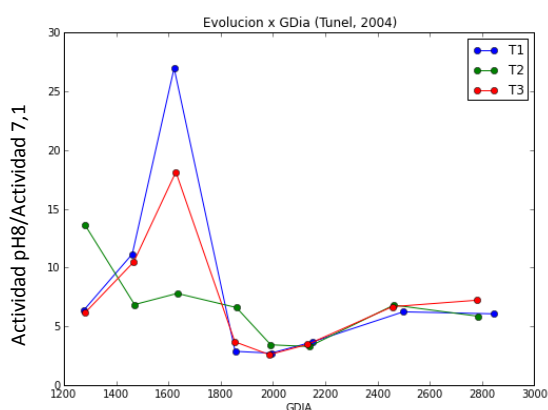
A) Activación glucosa-6P medida a pH7,3



B) Relación pH8/7,3



C) Activación glucosa-6P medida a pH7,1



D) Relación pH8/7,1

**Figura 5.14.** Grado de activación de la PEPC en función de la integral térmica (nivel fenológico del cultivo). Representación de la activación por glucosa-6P y la relación entre pHs en función de los grados-día para los tres tratamientos en la campaña 2003-2004. (—●—) Control; (—●—) T2; (—●—) T3.

### 3.5.1.7. Correlaciones entre la fosforilación de la PEPC y los demás parámetros estudiados durante la 1ª campaña

Para tratar de identificar las correlaciones de la fosforilación de la PEPC de raíz y el resto de parámetros medidos, se realizaron las correlaciones entre los indicadores del nivel de fosforilación (pH8/7,3; pH8/7,1; Activación con glucosa-6P a pH7,3; Activación con glucosa-6P a pH7,1; % Inhibición con málico 2 mM; % Inhibición con málico 3 mM). Los resultados se muestran en la tabla 5.3.

En las primeras filas se muestran los parámetros climáticos. La evapotranspiración potencial (EToC) y la ETo acumulada (filas 1, 2, 3) se correlaciona de forma inversa con la relación pH8/7,3

y la activación con glucosa-6P. Esto indica que atmósferas más secas implicarían una mayor fosforilación de la PEPC de la raíz.

Las filas 4-8 muestran las correlaciones con la integral térmica (GDIA). En este caso también es inversa, con lo que la fosforilación aumentaría al aumentar la edad del cultivo y también los grados día (GD). La temperatura mínima también se correlaciona inversamente con los niveles de fosforilación (filas 9-11): el aumento de las temperaturas mínimas implica una disminución de la relación pH8/pHs subóptimos y de la activación con glucosa-6P, por lo tanto un aumento en el grado de fosforilación de la PEPC. En la fila 12 se muestra la correlación con el nitrógeno  $\alpha$ -amino que también es inversa respecto a la activación con glucosa-6P, por tanto, mayores niveles de  $\alpha$ -amino se correlacionan con menores niveles de activación, lo que significa más fosforilación. A partir de la fila 13 se muestran los parámetros que están correlacionados de forma directa con los indicadores de fosforilación. La cantidad de glucosa, la producción de hojas, la actividad sacarosa sintasa y la cantidad de ATP se correlacionan de forma positiva con la activación por glucosa-6P y la relación entre pHs. Aumentos en los parámetros anteriormente citados supondrían que la PEPC se encuentra preferentemente en su forma desfosforilada. En las filas de la 18-26 se muestran parámetros relacionados con la cantidad de nitrógeno de la hoja y de proteína en la raíz. El aumento de estos parámetros iría unido a una disminución de la fosforilación de la PEPC de raíz.

**Tabla 5.3.** Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de activación de la PEPC (relación entre pHs, activación con glucosa-6P e inhibición con málico) y el resto de parámetros agronómicos, climáticos y metabólicos durante la primera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos del térmico. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes.

	VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P. (r)	N
1	EToC6d	PEPC-pH8/pH7,3	-0,549**	24
2	EToC4d	PEPC-pH8/pH7,3	-0,507*	24
3	EToC6d	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,591**	24
4	GDÍA	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,567**	24
5	GDÍA6d	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,553**	24
6	GDÍA4d	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,532**	24
7	GDÍA6d	PEPC-pH8/pH7,3	-0,526**	24
8	GDÍA2d	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,513*	24
9	TMIN	PEPC-pH8/pH7,3	-0,569**	24
10	TMIN	PEPC-pH8/pH7,1	-0,506*	24
11	TMIN	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,550**	24
12	RAAmino	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	-0,552**	24
13	Glucosa- Ugpf	PEPC-pH8/pH7,3	0,515**	27
14	ProdH	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,519**	24
15	SS -Ugpf	PEPC-pH8/pH7,3	0,514**	27
16	SS- Ugpf	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,522**	27

17	Adenilatos ATPnanoM	PEPC-pH8/pH7,3	0,552**	24
18	Proteína- Ugpf	PEPC-pH8/pH7,1	0,521**	27
19	NTL	PEPC-pH8/pH7,1	0,518*	20
20	NNMSP	PEPC-pH8/pH7,3	0,529*	20
21	NTL	PEPC-pH8/pH7,3	0,548*	20
22	NNMSP	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,557*	20
23	NTL	PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	0,615**	20
24	NTL	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,625**	20
<b>25</b>	<b>Proteína- Ugpf</b>	<b>PEPC-pH8/pH7,3</b>	<b>0,709*****</b>	<b>27</b>
26	NTP	PEPC-SIN-2mM-Inhibicion	0,981*	4

Durante esta campaña 2004, la **fosforilación de la PEPC de raíz es promovida** en las siguientes circunstancias:

- Aumento de la presión ambiental acumulada (estrés hídrico acumulado), la edad del cultivo y el aumento de la temperatura mínima.
- El aumento de nitrógeno  $\alpha$ -amino, que está relacionado con la acumulación de osmolitos compatibles en situaciones de déficit hídrico.
- La disminución de glucosa en la raíz, de producción foliar o de los niveles de ATP.
- La disminución de proteínas en la raíz o del nitrógeno en las hojas.

Esto parece indicar que las situaciones de estrés ambiental, las pérdidas de nitrógeno y la llegada de fotoasimilados en las raíces, promueven la fosforilación de la PEPC de raíz en remolacha azucarera durante esta primera campaña.

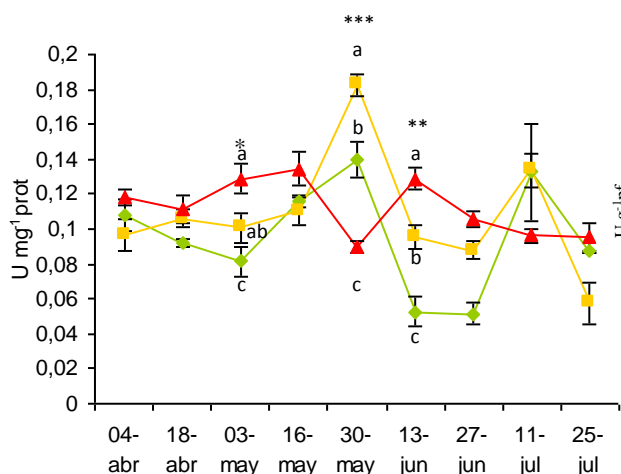
### 3.5.2. Campaña agrícola 2004-2005 (2ª campaña)

#### 3.5.2.1. Evolución de la actividad PEPC

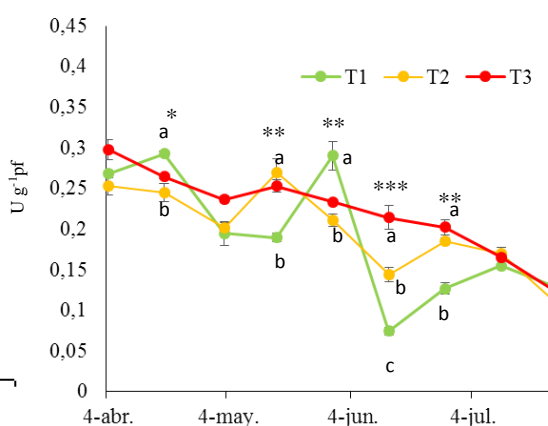
En esta campaña se encuentran valores de **actividad específica** de PEPC más bajos que los observados en campañas anteriores. Mientras que en el 2004 el rango de actividad a pH 8 se encontraba entre 0,08-0,26 U/mg prot (Fig. 5.1), en esta campaña los valores se distribuyen entre 0,05-0,18 U/mg prot (Fig. 5.15). La determinación de la actividad a pH óptimo de 8 nos da información de la cantidad de enzima existente, independientemente de su estado de activación. En este sentido, el tratamiento 3 presenta una mayor actividad específica a pH 8 en la mayoría de los muestreos, por lo tanto una mayor cantidad de enzima (Fig. 5.15).

En **actividad específica** se muestran dos picos relevantes para T1, T2 y T3, el tratamiento que sufrió mayor estrés, es en el que menos varía la actividad (Fig.5.15). El control y T2 sufren más variaciones a lo largo del periodo muestreado, mostrando ambos sus valores máximos en el 5º muestreo (30 de mayo). Los mínimos se alcanzan en el 7º (7 de junio) y para las tres condiciones en el muestreo final. Se encuentran diferencias significativas entre los tres tratamientos para la actividad total en los muestreos 3º, 5º y 6º.

En la **actividad total** (Fig.5.16), el perfil descendente se hace evidente en los tres tratamientos, mostrando T3 una clara estabilidad a lo largo del periodo estudiado. La actividad PEPC en el control es en la condición en la que más oscila, mostrando picos máximos en el 5º muestreo y el mínimo en el 6º. T2 se mantiene con niveles intermedios entre T1 y T3. La condición control presenta diferencia respecto a T2 y T3 en los muestreos 2º, 4º, 5º, 6º y 7º.



**Figura 5.15.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad específica de la PEPC medida a pH 8. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



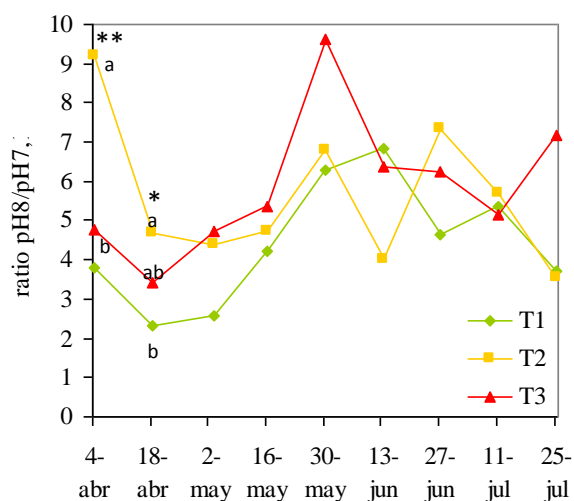
**Figura 5.16.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad total de la PEPC medida a pH 8. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

Estos resultados muestran una mayor estabilidad de la actividad PEPC en la condición del tratamiento T3 (túnel cerrado).

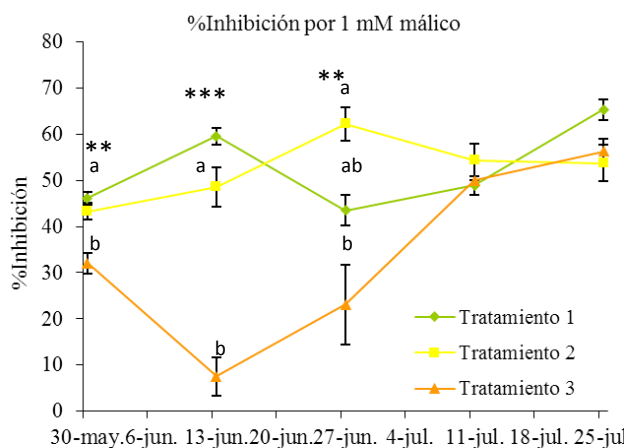
### **3.5.2.2. Niveles de fosforilación de la PEPC durante la 2ª campaña**

Los valores que indican el estado de fosforilación de la enzima muestran que también se encuentran importantes diferencias entre T1 y T3 en la relación **pH 8/pH 7,1** (Fig. 5.17). T3 mantiene en general niveles más altos del ratio pH8/7,1. T1 muestra en general los niveles más bajos. Sin embargo, ambos estarían por debajo de los valores alcanzados en todos los muestreos de la campaña anterior, donde los máximos llegaban a 16 (Fig. 5.7). Por lo que estos valores por debajo de 9 estarían en relación con una forma enzimática preferentemente fosforilada. En el mismo sentido encontramos los valores de % de **inhibición de la PEPC** en presencia de 1 mM de málico (Fig. 5.18). Sólo se midió la inhibición con málico a partir de 5º muestreo, con lo que el primer punto de la figura 5.18 coincide con el muestreo 5º, del 30 mayo. El tratamiento T3 muestra un perfil de descenso y luego aumento de la inhibición, que concuerda parcialmente con el perfil mostrado para el ratio pH8/7,1. Los valores de **activación con glucosa-6-P** (Fig.5.19) reproducen el efecto del pH sobre la activación de la campaña 2003/2004. A pH 8 no se produce activación y a pHs subóptimos de 7,1 y 7,3 si se activa la enzima (Chollet et al. 1996). Todos los valores de activación se encuentran por debajo de los máximos de la campaña anterior, en el rango de lo observado para los muestreos de junio y julio del 2004. En la campaña anterior se observó un alto grado de activación en el mes de abril y mayo (Fig. 5.9), que indicaba una enzima pobremente fosforilada. Esos resultados no se reproducen en esta campaña indicando que las mayores temperaturas y el déficit hídrico de la campaña dos, mantuvieron niveles más altos de fosforilación para la enzima.

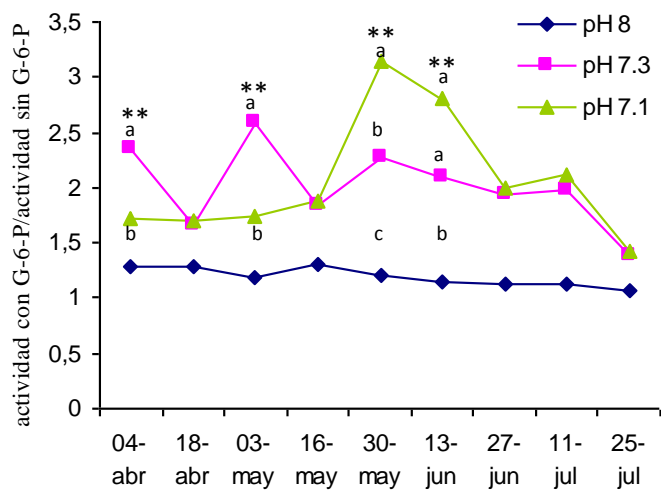
En general, los datos de activación por glucosa-6-P de esta campaña permanecen bajos lo que indica mayor estado de fosforilación de la PEPC.



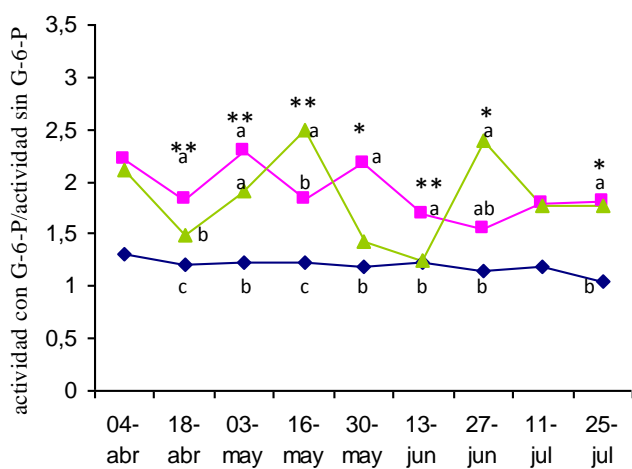
**Figura 5.17.** Medida de la evolución de la fosforilación de la PEPC: Relación entre las actividades a pH 8 y pH 7.1 (pH 8/ pH 7.1). (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



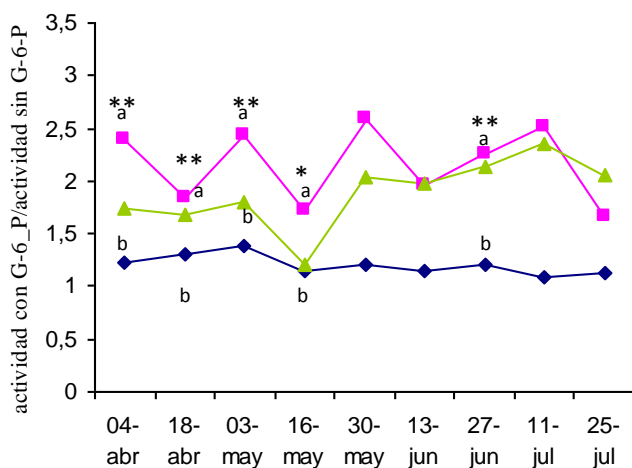
**Figura 5.18.** % de inhibición de la actividad PEPC medida a pH 7,3 en presencia de 1 mM de L-Malato para las 5 últimas fechas muestreadas y las tres condiciones de manejo. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



A) Tratamiento 1. Control



B) Tratamiento 2. Intermedio



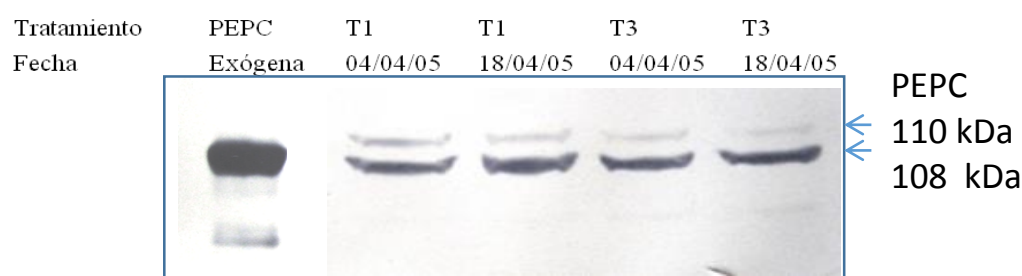
C) Tratamiento 3. Extremo

**Figura 5. 19.** Evolución a lo largo de los muestreos de la activación de la PEPC en presencia de glucosa-6-P a concentraciones saturantes (4 mM) y a distintos pHs, (actividad con G-6-P/actividad sin G-6-P). A) Control; B) T2; C) T3. (—♦—) pH 8; (—■—) pH 7,3; (—▲—) pH 7,1. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .



### 3.5.2.3. Estado de monoubiquitinación de la PEPC.

Durante la segunda campaña se realizaron Western blot de los extractos crudos de las condiciones T1 y T3 antes y después de recibir las plantas el golpe de calor (muestreos 1º y 2º) para buscar relaciones entre la monoubiquitinación el comportamiento de la PEPC y el estrés por calor recibido. La figura 5.20 muestra que estos dos primeros muestreos de abril son muy similares en cuanto al patrón de monoubiquitinación, con baja proporción de enzima monoubiquitinada como ocurría en las raíces de la primera campaña (Fig. 6.13), y en contraste con el patrón de las hojas (Fig. 5.12) que mostraba un alto grado de monoubiquitinación de la enzima con una relación de banda 110/107 de 1. Los datos confirman por tanto que la PEPC de raíces está menos ubiquitinada que la de las hojas. En cuanto a los tratamientos de calor se observa una ligera disminución de la banda de 110 kDa en las plantas tratadas (T3). Se resalta que en esta campaña la monoubiquitinación de la PEPC, aunque baja, fue mayor que en la 1ª campaña (comparar Fig. 5.20 y Fig. 5.13).



**Figura 5.20.** Western realizado en la condición T1 y T3 antes y después del golpe de calor de abril recibido por las plantas del túnel. Se cargaron 0,1 U de PEPC purificada control (PEPC exógena) y 0,08 U de PEPC para los muestreos.

### 3.5.2.4. Correlaciones de la actividad PEPC con el resto de parámetros estudiados durante la 2ª campaña.

Las correlaciones de la actividad PEPC a pH8 durante esta segunda campaña se muestran en la tabla 5.4. Existen numerosas coincidencias con la campaña anterior, de hecho en la mayoría de los parámetros coinciden las correlaciones de esta segunda campaña con los de la campaña anterior. Cabe destacar algunas diferencias.

En esta segunda campaña, la actividad PEPC sólo se correlaciona con la Tª mínima (TMIN, fila 8). Durante la campaña anterior, la actividad PEPC a pH 8 mostraba altísimas correlaciones con la temperatura máxima y media. Con la evapotranspiración puntual y acumulada (EToC, fila 4-7) también se debilita la correlación: durante esta segunda campaña las correlaciones son inversas también, pero con menor *r* y menor significación que en el 2004. La relación de la actividad PEPC a

pH 8 y el estado de desarrollo del cultivo es inversa (GDÍA, filas 1-3), igual que en la campaña del 2004.

Muy interesante es la correlación de la actividad PEPC con el brix de la raíz (BRIX, fila 13). En esta campaña este parámetro presenta una correlación inversa con la actividad PEPC total con un mayor  $r$  (0,7 en el 2005; 0,5 en el 2004) y sobre todo una significación muy alta ( $3,98 \cdot 10^{-5}$  en el 2005; 0,011 en el 2004). El aumento del brix de la raíz (mayor concentración de sustancias en disolución) coincide con la disminución de la actividad PEPC.

La correlación con el nitrógeno nítrico en jugo de peciolo (NNJUP, fila 17) que también aparece en la campaña anterior, es mucho menos significativa e importante en esta segunda campaña.

En esta segunda campaña, la actividad PEPC a pH8 no muestra correlación con parámetros con los que si estaba relacionada en la campaña anterior: el sodio, la glucosa en raíz y la actividad total invertasa ácida.

También surgen nuevas correlaciones en esta campaña que no aparecían en la campaña anterior. En esta campaña, la PEPC muestra una correlación inversa con el total de azúcar producido por Ha (Az/Ha, fila 14), y la cantidad de ATP muestra una correlación directa con la actividad PEPC (fila 19).

En esta segunda campaña la actividad PEPC tiene menor relación con los parámetros de ETo y mucha más relación con el brix de la raíz.

**Tabla 5.4.** Correlaciones entre la actividad PEPC (total y específica medida a pH 8, pH 7,3, pH 7,1) y los parámetros climáticos y agronómicos durante la segunda campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídricos y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.< $10^{-5}$ . Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes.

	Variable 1	Variable 2	C.P. (r)	N
1	<b>GDÍA</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,771*****</b>	<b>27</b>
2	GDÍA4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,641***	27
3	GDÍA6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,724*****	27
4	EToC6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,646***	27
5	EToC4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,637***	27
6	EToC2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,618***	27
7	EToC	PEPC-pH8-U/gpf	-0,562**	27
8	Tª MIN	PEPC-pH8-U/gpf	-0,507**	27
9	<b>ProdMSR</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,755*****</b>	<b>24</b>
10	<b>%MSR</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,736*****</b>	<b>25</b>
11	<b>ProdMSPI</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,736*****</b>	<b>24</b>
12	RPol	PEPC-pH8-U/gpf	-0,706***	24
13	<b>BRIX</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,705*****</b>	<b>27</b>
14	Az/Ha	PEPC-pH8-U/gpf	-0,701***	23
15	ProdR	PEPC-pH8-U/gpf	-0,682***	26
16	ProdPI	PEPC-pH8-U/gpf	-0,515**	26
17	NNJUP	PEPC-pH8-U/gpf	0,572**	20

18	Potasio	PEPC-pH8-U/gpf	0,623**	24
19	ATP nanoM	PEPC-pH8-U/gpf	0,627**	24
20	SS- Ugpf	PEPC-pH8-U/gpf	0,658***	27
21	<b>Proteína -Ugpf</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>0,718*****</b>	<b>27</b>

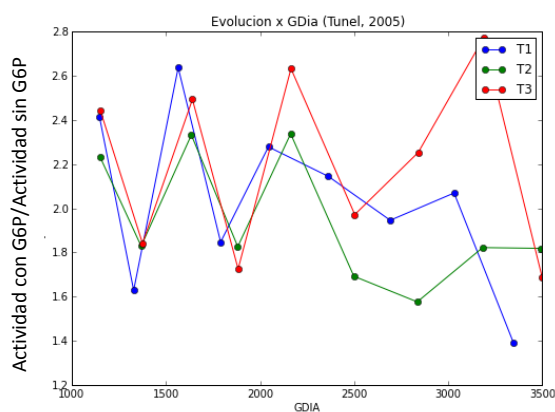
### 3.5.2.5. Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de fosforilación de la PEPC durante la 2ª campaña

Durante esta segunda campaña también se encuentran correlaciones importantes entre los parámetros relacionados con la fosforilación de la PEPC. Existe una correlación positiva alta entre la activación por G6P a pH 7,1 y la relación de actividad pH8/pH7,1 (Tabla 5.5, y Fig. 5.21, C y D) de tal forma que cuando aumentan los dos parámetros es indicativo de una enzima pobremente fosforilada. Sin embargo no se encontró correlación de la activación con glucosa a pH7,3 y la relación pH8/pH7,3 (Fig. 5.21 A y B) o con la sensibilidad al málico (dato no mostrado), parámetros que sí estaban correlacionados en la primera campaña.

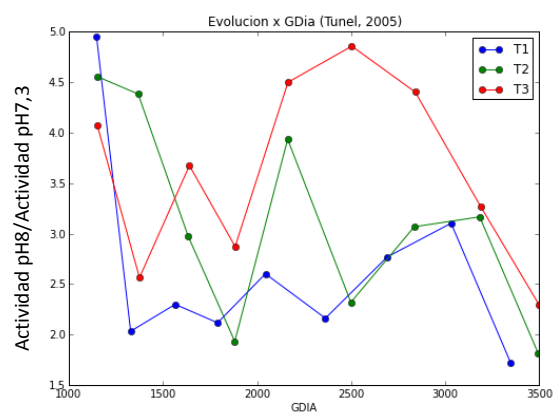
**Tabla 5.5.** Correlaciones entre la activación de la PEPC con G6P y la relación de actividad y pH8/pH 7,1. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídricos y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>.

VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P. (r)	N
PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	PEPC-pH8/pH7,1	0,730****	27

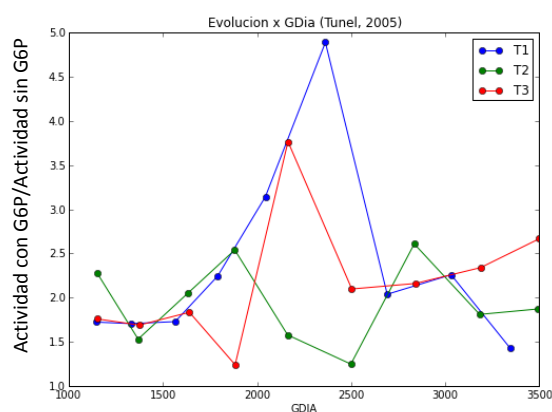
La figura 5.21 muestra la relación pH 8/pHs subóptimos y la activación con glucosa-6P, con la integral térmica (GDÍA). En la figura 5.21 A y B se observa esta falta de correlación entre las variables a pH7,3. En las figuras 5.21 C) y D) se observa que ambas variables se correlacionan de forma más significativa a pH 7,1. Durante esta segunda campaña hay menos concordancia entre los parámetros indicadores de la regulación de la PEPC por fosforilación que en la campaña anterior.



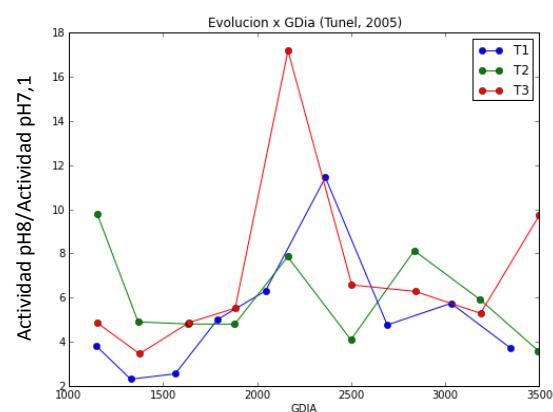
A) Activación con glucosa-6P a pH 7,3



B) Relación pH8/7,3



C) Activación glucosa-6P a pH 7,1



D) Relación pH8/7,1

**Figura 5.21.** Grado de activación de la PEPC en función de la integral térmica (nivel fenológico del cultivo). Representación de la activación por glucosa-6P y la relación entre pHs en función de los grados-día para los tres tratamientos en la campaña 2004-2005. (-●-) Control; (-●-) T2; (-●-) T3.

Se muestran a continuación las correlaciones con la relación pH 8/7,3 y la activación en presencia de glucosa-6P a pH7,3 (Tabla 5.7).

**Tabla 5.7.** Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de activación de la PEPC (relación entre pH8/7,3, activación con glucosa-6P a pH 7,3) y el resto de parámetros agronómicos, climáticos y metabólicos durante la segunda campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: nº de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001; (\*\*\*\*) sign. <0,0001; (\*\*\*\*\*) sign. <10<sup>-5</sup>.

VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P. (r)	N
ProdPI	PEPC-pH8/pH7,3	-0,578**	26
ProdR	PEPC-pH8/pH7,3	-0,551**	26
ProdMSPI	PEPC-pH8/pH7,3	-0,523**	24
RPol	PEPC-pH8/pH7,3	-0,511*	24
RSodio	PEPC-pH8/pH7,3	0,526**	24
TªMEDIA	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,500**	27
TªMAX	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	0,604***	27
NNJUP	PEPC-pH8/pH7,3	0,706****	20

Según estas correlaciones, los PEPC estaría **más fosforilada** en relación a:

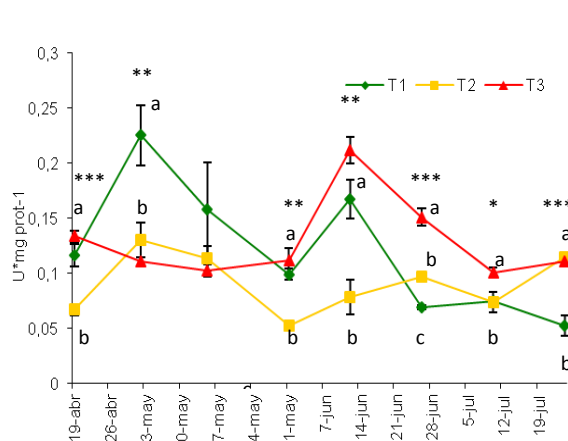
- Un aumento de la producción de raíz, de peciolo o de materia seca de peciolo
- El aumento de la polarización
- La disminución del sodio
- Menores temperaturas medias y máximas
- La disminución del nitrógeno nítrico en jugo de peciolo.

### 3.5.3. Campaña agrícola 2005-2006 (3ª campaña)

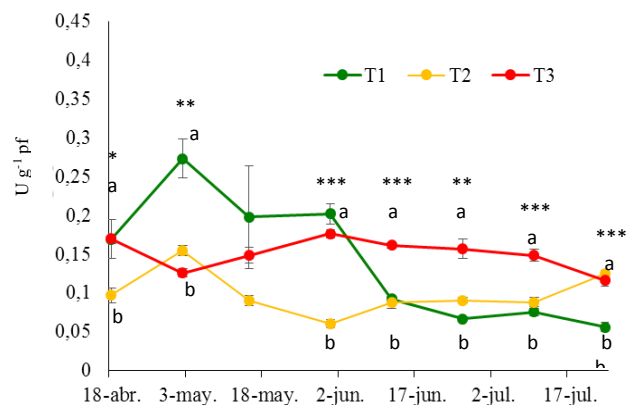
#### 3.5.3.1. Evolución de la actividad PEPC durante la 3ª campaña

Durante esta campaña se evaluó de nuevo la actividad PEPC y se realizaron diferentes ensayos para determinar su grado de fosforilación en la raíz en cada uno de los muestreos y condiciones de cultivo del ensayo térmico. Se determinó la actividad PEPC a pH óptimo, y subóptimos, 7, 1 y 7,3 y se calculó su relación. La relación pH 8/pH 7,3 o 7,1 disminuye cuando la enzima presenta mayor grado de fosforilación. Además, como en la campaña anterior, se evaluó el grado de activación con glucosa 6P, su efector positivo. La activación por glucosa-6P depende del pH, y es mayor a pHs fisiológicos (Echevarría et al. 1994; Wedding et al. 1989).

En esta campaña se encuentran valores de **actividad específica** para la PEPC en torno a los observados en la campaña anterior, con excepción de las subidas pronunciadas para T1 durante el 2º muestreo (0,23 U/mg prot) y para T1 y T3 en el 5º muestreo (0,17 y 0,21 U/mg prot respectivamente). Existen diferencias significativas entre los tratamientos en todos los muestreos excepto en el 3º. Las remolachas de la condición control (T1) muestran mayores valores en los primeros muestreos y a partir del 4º (31 de mayo) hasta el final, los valores de T3 se mantienen por encima del control. (Fig. 5.21).



**Figura 5.21.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad específica de la PEPC medida a pH 8. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



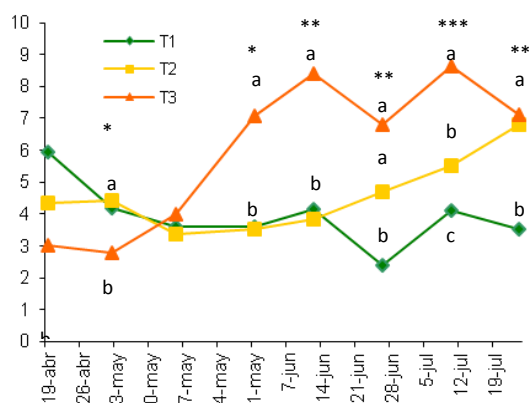
**Figura 5.22.** Evolución a lo largo de los muestreos de la actividad total de la PEPC medida a pH 8. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; Las barras de error muestran  $\pm$  EE. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

En cuanto a la **actividad total**, encontramos valores dentro del rango de las dos campañas anteriores. Cabe destacar que sigue un patrón similar a la específica para la condición control (Fig. 5.22), mostrando mayores valores durante los muestreos 2º, 3º y 4º. A partir del 31 de mayo de nuevo, es la condición T3 la que presenta mayores valores en los siguientes cuatro muestreos pero por un

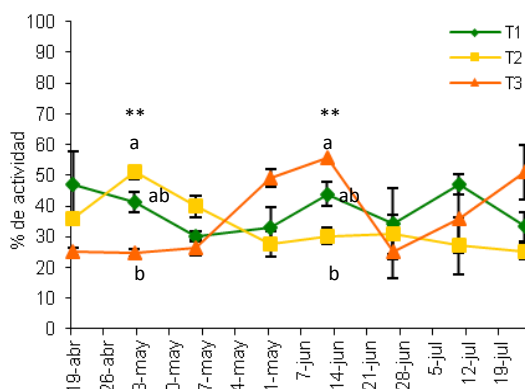
descenso de la actividad total de las plantas en la condición control, ya que las remolachas de la condición T3 mantienen valores muy estables a lo largo del periodo estudiado. Las raíces de la condición T2, muestran los valores más bajos para este parámetro durante la campaña 2005/2006.

### 3.5.3.2. Niveles de activación de la PEPC

La relación **pH8/pH 7,1** (Fig. 5.23) muestra diferencias estadísticamente significativas entre el control y T3 en todos los muestreos excepto en el 1º y el 3º. En el mes de abril, el control permanece con mayores valores de este ratio que T3. A partir de cuarto muestreo, T3 es el que mantiene altos valores de la relación pH8/pH7,1, manteniéndose por encima del control hasta el final del ensayo. La relación pH 8/7,1 en T3 muestra mayor grado de desfosforilación de la PEPC en las remolachas de junio y julio.



**Figura 5.23.** Medida de la evolución de la fosforilación de la PEPC: Relación entre las actividades a pH 8 y pH 7.1 (pH 8/ pH 7.1). (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



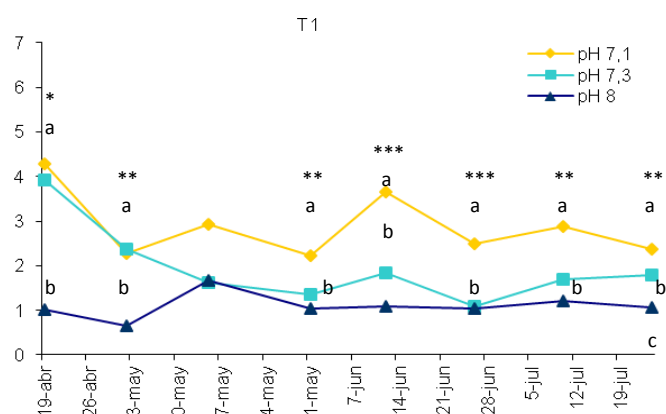
**Figura 5.24.** % de actividad PEPC que se mantiene medida a pH 7,3 en presencia 1 mM de L-Malato para las fechas muestreadas en las tres condiciones de manejo. (—♦—) Control; (—■—) T2; (—▲—) T3; ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

También se midió la influencia la sensibilidad de la enzima a su efector negativo L-malato. Altos grados de inhibición del orden del 80 % indican que la enzima está pobremente fosforilada (Echevarría et al. 1994). La figura 5.24 muestra que durante los primeros muestreos, la PEPC de las plantas T3 se inhibía menos que la enzima de las plantas de la condición control y T2 y a partir de mayo suben ligeramente los valores para T3 en el 4º y 5º muestreo. En general los valores de inhibición con 1 mM de l-malato no son altos, lo que indicaría que excepto de los nuestros 4º y 5º de T3, la PEPC se encontraría preferentemente en su forma fosforilada. Estos datos concuerdan en parte con los obtenidos para la relación pH8/pH7,3 que nos muestran una enzima fosforilada en los primeros muestreos aunque pobremente fosforilada en los nuestros de junio y julio en T3.

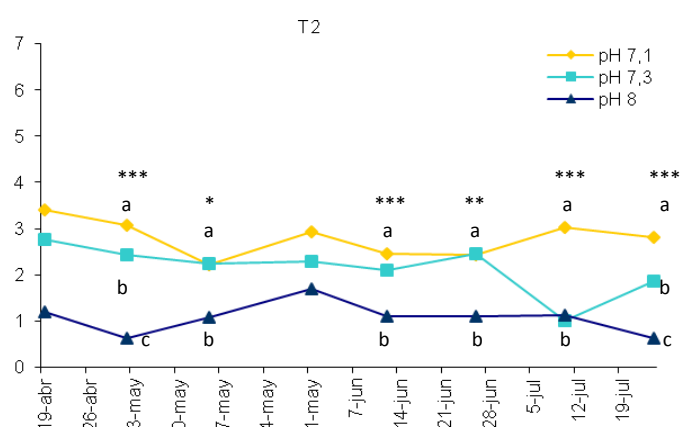
Comparando los tres tratamientos, eso se observa tanto en la relación pH8/pH 7,3 como en la sensibilidad al L-malato (Fig. 5.23 y 5.24).

En cuanto a los niveles de **activación con glucosa-6P** (Fig 5.25), de nuevo vuelve a diferenciarse el grado de activación alcanzado a distintos pHs, siendo los mayores grados de activación a pHs fisiológicos, sobre todo a pH 7,1. La diferencia de actividad entre los distintos pHs es estadísticamente significativa en todos los muestreos para T1 excepto el 3º, en todos los muestreos de T2 excepto el 4º y en todos los muestreos de T3. Además, es la condición T3 la que muestra mayores valores de activación de la actividad PEPC en presencia de glucosa-6P, alcanzando valores de 6 veces más actividad con glucosa-6P que sin ella. En la condición control y T2, la activación es sensiblemente menor, permaneciendo alrededor de 3, que corresponde a los niveles más bajos encontrados en la campaña 2003/2004 (Fig. 5.9).

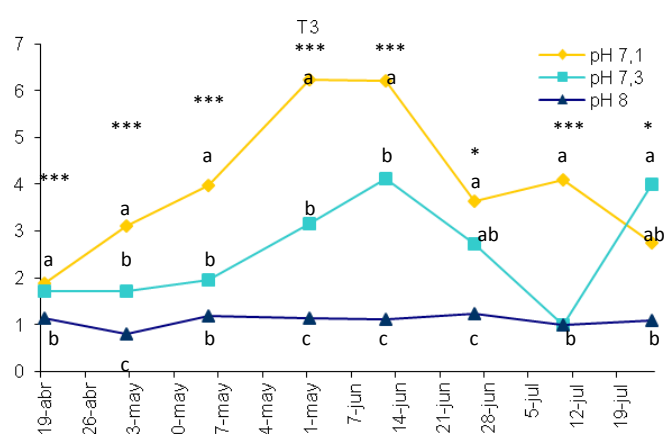




A) Condición control (T1)



B) Condición T2



C) Condición T3

**Figura 5.25.** Evolución a lo largo de los muestreos de la activación de la PEPC en presencia de Glucosa-6-P a concentraciones saturantes (4 mM) y a distintos pHs, (actividad con G-6-P/actividad sin G-6-P). A) Control; B) T2; C) T3. (-▲-) pH 8; (-■-) pH 7,3; (-◆-) pH 7,1. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

El análisis conjunto de los parámetros relacionados con la activación de la PEPC en condiciones fisiológicas, aporta que durante esta 3ª campaña, la PEPC de raíz estaría más desfosforilada en la condición T3, que fue la que sufrió el mayor estrés térmico. En cambio, las plantas de la condición control muestran para esta campaña mayores niveles de fosforilación comparada con el tratamiento T3.

### ***3.5.3.3. Correlaciones de la actividad PEPC a pH 8 durante la 3ª campaña***

La actividad PEPC a los distintos pHs durante esta tercera campaña, mostró correlaciones positivas con la actividad en presencia de todas las concentraciones de málico ensayadas y las actividades en presencia de glucosa-6P. Además, surgieron correlaciones entre la actividad PEPC total a pH 8 y parámetros agronómicos, ambientales y metabólicos que se muestran en la tabla 5.8. La actividad total PEPC muestra correlaciones negativas con los grados días puntuales y acumulados (filas 1-4), siendo mayor el coeficiente de Pearson cuanto mayor es el número de día acumulados. Disminuye la actividad PEPC total a lo largo del desarrollo del cultivo.

También muestra una relación inversa con la ETo puntual y acumulada (filas 5-9), lo que vuelve a mostrar que una atmósfera seca disminuye la actividad PEPC.

Las temperaturas medias y mínimas también muestran una correlación inversa como en campañas anteriores (filas 10-11).

El aumento del porcentaje de materia seca de raíz va acompañado de una reducción de la actividad total de PEPC (fila 12). De nuevo, la actividad SS total se relaciona de forma directa con la actividad PEPC. Estas correlaciones se han encontrado también en las dos campañas anteriores. Cabe destacar la correlación con el brix encontrada en las otras dos campañas para la actividad a pH 8. En general, en esta tercera campaña, la actividad PEPC total muestra un menor número de correlaciones que en campañas anteriores.

**Tabla 5.8.** Correlaciones entre la actividad PEPC (total y específica medida a pH 8, pH 7,3, pH 7,1) y los parámetros climáticos y agronómicos durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídricos y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign. <0,05; (\*\*) sign. <0,01; (\*\*\*) sign. <0,001; (\*\*\*\*) sign. <0,0001; (\*\*\*\*\*) sign. <10<sup>-5</sup>.

	VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P.(r)	N
1	GDIA6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,855****	16
2	GDIA4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,835****	16
3	GDIA2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,718**	16
4	GDIA	PEPC-pH8-U/gpf	-0,668**	16
5	ETo	PEPC-pH8-U/gpf	-0,703**	16
6	EToC4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,637**	16
7	EToC6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,617*	16
8	EToC2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,613*	16
9	EToC	PEPC-pH8-U/gpf	-0,540*	16
10	TªMEDIA	PEPC-pH8-U/gpf	-0,557*	16
11	TªMIN	PEPC-pH8-U/gpf	-0,532*	16
12	PORMSR	PEPC-pH8-U/gpf	-0,559**	21
13	SS-Ugpf	PEPC-pH8-U/gpf	0,509*	24

#### 3.5.3.4. Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de fosforilación de la PEPC durante la 3ª campaña

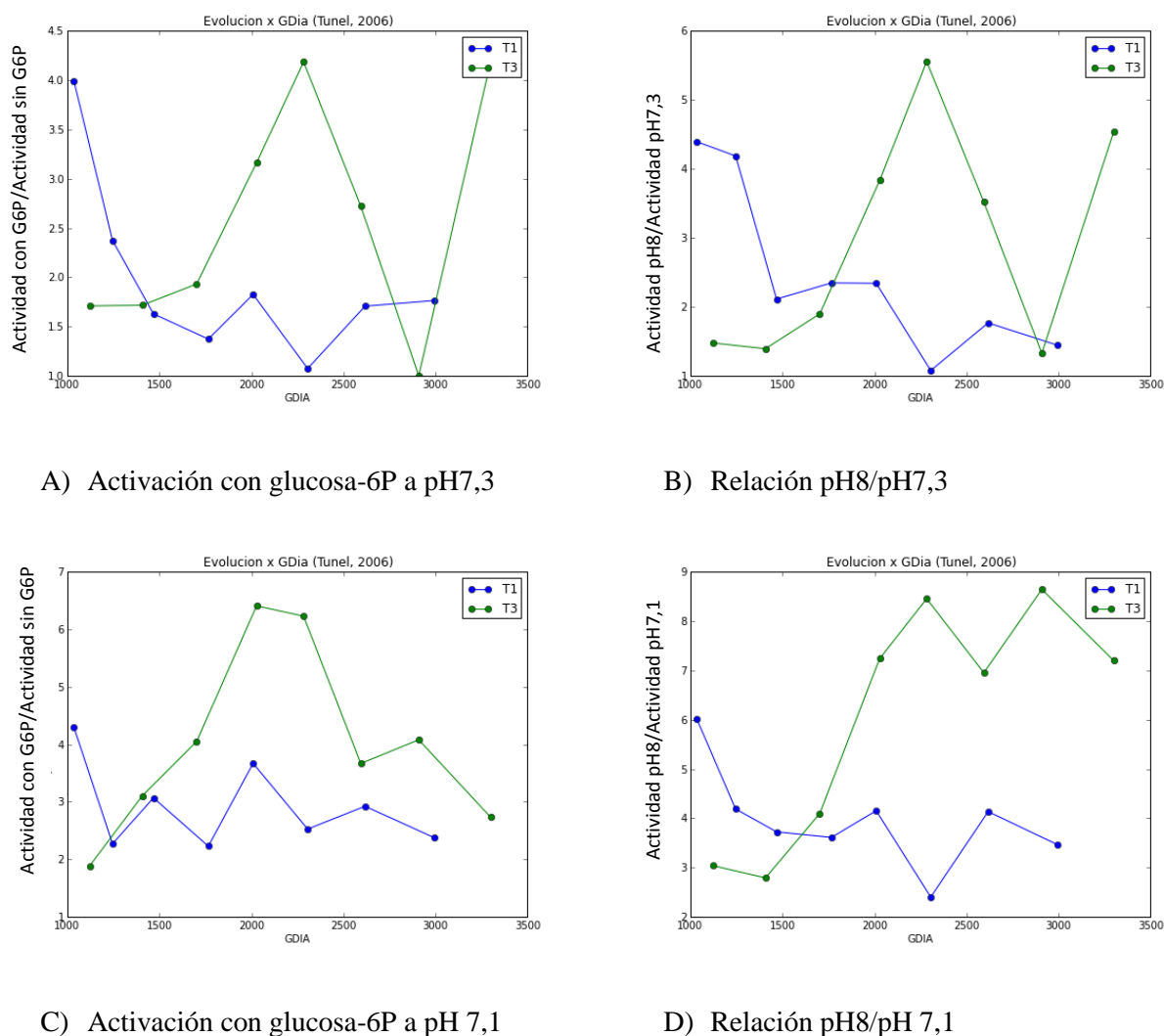
En esta tercera campaña vuelve a haber mayor número de correlaciones entre los tres parámetros que indican fosforilación de la PEPC, como en la primera campaña. Hay correlaciones positivas entre las medidas de activación con glucosa-6P y la relación pH8/pH subóptimos (filas 3, 4, 7, 8 y 9). El % de inhibición con 1mM de málico muestra correlaciones inversas con la activación con glucosa-6P a pH 7,3 y con la relación pH8/7,3, como en la 2ª campaña. Esta discrepancia entre los indicadores de fosforilación podrían venir del hecho de que tratamientos con alta temperatura pueden disminuir la sensibilidad al málico de la enzima sin que dicha bajada esté relacionada con la fosforilación (Chinthapalli et al. 2003).

**Tabla 5.9.** Correlaciones entre los diferentes parámetros medidos para determinar el grado de activación de la PEPC por fosforilación durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>. Se han marcado en negrita las correlaciones con significaciones más importantes.

	Variable 1	Variable 2	C.P.(r)	N
1	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	PEPC-SIN-1mM-Inhibicion	-0,744***	21
2	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-SIN-1mM-Inhibicion	-0,649**	21
3	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	PEPC-pH8/pH7,1	0,513*	23
4	PEPC-pH7,3-ActivacionG6P	PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	0,514*	23
7	PEPC-pH8/pH7,3	PEPC-pH8/pH7,1	0,602**	23

8	PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	PEPC-pH8/pH7,1	0,655***	23
9	<b>PEPC-pH7,3-ActivacionG6P</b>	<b>PEPC-pH8/pH7,3</b>	<b>0,804*****</b>	<b>24</b>

En la figura 5.25 se representando la activación con glucosa-6P y la ratio de pHs frente a la integral térmica de esta tercera campaña. Se hace evidente la correlación entre estos parámetros indicadores del estado de fosforilación y muestran una alta concordancia, como lo observado en la primera campaña (Fig. 5.14) y no en la segunda (Fig. 5.21).



**Figura 5.26.** Grado de activación de la PEPC en función de la integral térmica (nivel fenológico del cultivo). Representación de la activación por glucosa-6P y la relación entre pHs en función de los grados-día para los tres tratamientos en la campaña 2003-2004. (-●-) Control; (-●-) T3.

Se realizaron las correlaciones de los tres parámetros indicadores del estado de fosforilación de la enzima con el resto de variables agronómicas y metabólicas (Tabla 5.10). El % de inhibición en presencia de 1mM de málico no se correlacionó con ningún parámetro estudiado con un nivel de significación suficiente. Las correlaciones con el resto de parámetros se muestran en la tabla 5.10.

Los resultados muestran que durante esta segunda campaña, el nivel desfosforilación de la PEPC aumenta junto con:

- El aumento de la producción de peciolo, el potasio de la raíz, el número de hojas por planta, la producción de hojas y de su materia seca. La producción foliar (en la fase de crecimiento) aumenta la fosforilación de la PEPC de raíz.
- Valores más bajos de nitrógeno alfa amino y grados-día.

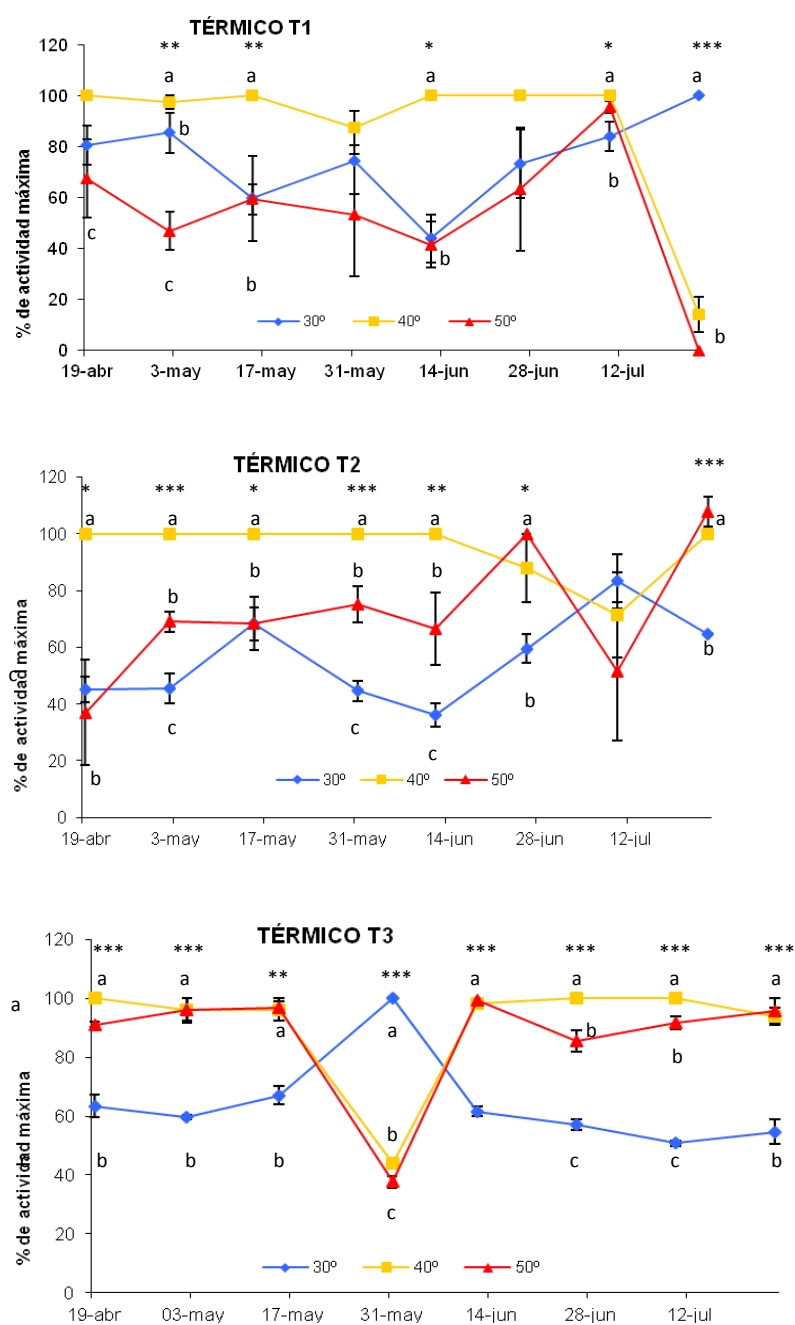
**Tabla 5.10.** Correlaciones entre los parámetros indicadores del nivel de activación de la PEPC (relación entre pHs, activación con glucosa-6P e inhibición con málico) y el resto de parámetros agronómicos, climáticos y metabólicos durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001; (\*\*\*\*\*) sign.<10<sup>-5</sup>.

	VARIABLE 1	VARIABLE 2	C.P.(r)	N
1	ProdPl	PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	-0,593**	23
2	ProdPl	PEPC-pH8/pH7,1	-0,504*	23
3	RPotasio	PEPC-SIN-005mM-Inhibicion	-0,575**	24
4	Hojas/Pl	PEPC-pH8/pH7,1	-0,530**	23
5	ProdMSH	PEPC-pH8/pH7,1	-0,517*	20
6	ProdH	PEPC-pH8/pH7,1	-0,503*	23
7	RAAmino	PEPC-pH7,1-ActivacionG6P	0,542**	23
8	GDIA4d	PEPC-SIN-005mM-Inhibicion	0,545*	16
9	GDIA6d	PEPC-SIN-005mM-Inhibicion	0,577*	16

### 3.5.4. El efecto de la temperatura in vitro sobre la actividad PEPC

Durante esta 3ª campaña también se hicieron ensayos para determinar la resistencia in vitro de la actividad de la PEPC a diferentes Tª y establecer alguna relación con los tratamientos recibidos a lo largo el estado de desarrollo. La resistencia in vitro a la temperatura ha sido estudiada en ensayos en discos foliares comparando la actividad PEPC de plantas C<sub>3</sub> y plantas C<sub>4</sub> determinada a diferentes Tª, siendo estas últimas, las que presentabas una mayor temperatura óptima (45 °C para la PEPC C<sub>4</sub> y 30 °C para la PEPC C<sub>3</sub>). Además, se ha descrito que en la activación por temperatura no está involucrada la fosforilación de la PEPC (Chinthapalli et al. 2003). Para este estudio se utilizaron las muestras de la tercera campaña y se midió la actividad de la PEPC a pH 8 a tres temperaturas, 30 °C, 40 °C y 50 °C. La figura 5.27 muestra que para el control T1 y el tratamiento T2, la temperatura óptima de la PEPC se mantiene a 40 °C durante gran parte de los muestreos iniciales (los 6 primeros muestreos en T1 y para los 5 primeros muestreos en T2). Sin embargo, en el muestreo 7 de T1, la actividad PEPC se mantiene alta a las tres Tª ensayadas y luego decae bruscamente en el último manteniéndose solo activa a Tª de 30 °C. En el tratamiento T2 la actividad a las tres temperaturas tienden a igualarse en los últimos muestreos y en el Tratamiento T3 los óptimos de temperatura de

la PEPC se mantienen a 40 y 50 °C excepto en el 4º muestro. Estos datos muestran una aclimatación a altas temperaturas de la planta (Tratamiento T3 y los muestreos de junio y julio) que en los referente a la PEPC se manifiesta en una ampliación del rango de temperaturas óptimas de la PEPC. Este dato es muy significativo ya que no hay muchos estudios de la respuesta de la PEPC a temperaturas altas. Los únicos estudios realizados en *Amaranthus* (una planta C<sub>4</sub>) muestran que dicha aclimatación de la PEPC a altas temperaturas no cursa por una fosforilación de la enzima (Chinthapalli et al. 2003). La tabla 5.11 muestra las diferencias significativas entre tratamientos, para cada temperatura en función del muestreo. Las letras a, b y c indican diferencias significativas entre los dos muestreos, siendo “a” el valor mayor de los dos comparados. Todos los muestreos menos el 6º muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos control y T3. Un dato a destacar es que los mayores valores de actividad PEPC (A) a 30 °C se concentran en el control T1 mientras que a 50 °C se concentran en el tratamiento T3 (tratamiento más estresado). Por lo tanto, el choque térmico del ensayo generó cambios en la PEPC de la raíz que afectaban a su actividad in vitro medida a altas temperaturas. Estos resultados son relevantes, ya que no existen muchos datos en la literatura donde se vea una aclimatación de la PEPC a altas temperaturas que quede reflejado en óptimos más elevados de temperatura para la catálisis (Tabla 5.11, mayor número de “a” en T3 a 50 °C).



**Figura 5.27.** Evolución de la actividad PEPC determinada a diferentes  $T^a$ , a lo largo de los muestreos de la 3ª campaña para las diferentes condiciones del ensayo (T1, T2, T3). Se expresa en % respecto a la máxima actividad medida a diferentes temperaturas in vitro (---) 30 °C, (---) 40 °C, (---) 50 °C. ANOVA I y Tukey-b, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.

**Tabla 5.11.** Muestreos con diferencias significativas entre los tratamientos (T1, T2, T3) para el ensayo de resistencia térmica in vitro para la PEPC. Se indican los muestreos con diferencia significativa para cada temperatura ensayada. ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ . Tukey b. La letra a designa al mayor valor y c al menor valor. Letras distintas indican grupos distintos.

Tª	MUESTREO	T1	T2	T3
30°	1° 19/04/06	a	b	ab
	2° 02/05/06	a	a	b
	4° 31/05/06	ab	a	b
	7° 10/07/06	a	a	b
40°	4° 31/05/06	a	a	b
50°	2° 02/05/06	c	b	a
	3° 15/05/06	b	ab	a
	5° 12/06/06	b	ab	a
	7° 10/07/06	b	a	a

Se ha descrito que el aumento de la temperatura tiene en la PEPC efectos similares a la fosforilación: aumento de la actividad y disminución de la sensibilidad al málico sin que se detecte fosforilación de la enzima (Chinthapalli et al. 2003). Esto podría estar relacionado con cambios de conformación de la enzima (oligomerización, cambios en los microambientes como bolsillos hidrofóbicos) (Chinthapalli et al. 2003). Nuestros resultados parecen indicar además, que los mecanismos que operan para aumentar el óptimo de actividad de la PEPC de plantas sometidas a altas temperaturas, afectan más a la actividad de la enzima desfosforilada de T3 que a la forma que se da preferentemente en T2 y T1 en la tercera campaña.

Se analizaron las correlaciones de la actividad PEPC a diferentes temperaturas in vitro (Tabla 5.12) con los parámetros agronómicos, con las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa y con la PEPC. Se encuentran diferencias entre relaciones con los parámetros de la actividad PEPC determinada tanto a 50 °C como a 40 °C. A 40 °C la actividad PEPC se correlaciona de forma positiva con la actividad pH 7,1 (filas 9,10) mientras que esa correlación no se da a los 50 °C lo que está de acuerdo con que el óptimo de actividad a 40 °C se relaciona preferentemente con la forma de la enzima fosforilada, mientras que a 50 °C no se encuentra dicha relación. La PEPC a 50 °C presenta unas correlaciones directas con la Tª máxima del cultivo (fila 1), con la prolina (fila 5) y con el contenido de sodio (fila 6), todos ellos parámetros indicativos de estrés.

En cambio, la actividad PEPC a 40 °C se correlaciona de forma inversa con el estado fenológico del cultivo (GDÍA, fila 8) y directa con varios parámetros de producción foliar (hojas por planta, fila 11 y 12; con la cobertura, fila 13; la producción de hojas, fila 14 y el LAI, fila 17). También muestra correlaciones directas con el potasio de la raíz (fila 15) y la actividad sacarosa sintasa (fila 16). Parece que en la resistencia térmica in vitro a 50 °C están implicados mecanismos



que afectan a la PEPC en condiciones de estrés hídrico y que en la resistencia a 40°C estarían implicados mecanismos relacionados con el desarrollo de los órganos fotosintético.

**Tabla 5.12.** Correlaciones entre las medidas relacionadas con la resistencia térmica in vitro (actividad PEPC a diferentes temperaturas in vitro y activación de la PEPC a T<sup>a</sup> supraóptimas) y el resto de parámetros agronómicos, climáticos y metabólicos durante la tercera campaña. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Se muestran con asteriscos las significaciones: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01; (\*\*\*) sign.<0,001; (\*\*\*\*) sign.<0,0001.

	Variable 1	Variable 2	C.P. (r)	N
1	TMAX	PEPC-SIN-50°-ACTTm	0,535*	16
2	EToC6d	PEPC-SIN-50°-Ugpf	-0,570*	16
3	EToC4d	PEPC-SIN-50°-Ugpf	-0,570*	16
4	HTMAX	PEPC-SIN-50°-Ugpf	0,559*	16
5	Prolina-Raíz-Ugpf	PEPC-SIN-50°-Umgprot	0,522**	24
6	RSodio	PEPC-SIN-50°-Ugpf	0,549**	24
7	PEPC-CON-pH7,1-Umgprot	PEPC-SIN-50°-Umgprot	0,551**	24
8	GDIA	PEPC-SIN-40°-Ugpf	-0,507*	16
9	PEPC-pH7,1-U/mgprot	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,503*	24
10	PEPC-pH7,1-U/mgprot	PEPC-SIN-40°-Umgprot	0,574**	24
11	Hojas/Pl	PEPC-SIN-40°-Umgprot	0,508*	24
12	Hojas/Pl	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,512*	24
13	CobEstLAI	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,563*	18
14	ProdH	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,586**	24
15	RPotasio	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,625**	24
16	SS-Ugpf	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,633***	24
17	LAI	PEPC-SIN-40°-Ugpf	0,662**	18

### 3.5.5. Patrones y evolución de la actividad PEPC a lo largo de las tres campañas

Se presenta a continuación un análisis conjunto de las tres campañas en relación con los parámetros estudiados para la PEPC.

La evolución de la actividad específica a lo largo de las tres campañas muestra que en la primera y la tercera campaña la actividad de la PEPC se mueve entre los mismos rangos, 0,05 U mg prot<sup>-1</sup> y 0,25 U mg prot<sup>-1</sup>. Durante la segunda campaña, la actividad de esta enzima muestra valores mucho menores, permaneciendo siempre por debajo de 0,18 U, y 0,14 U mg<sup>-1</sup> prot para T3. Las condiciones agronómicas de la campaña del 2004-2005 causaron descensos importantes en la actividad específica de la PEPC.

Hay otro patrón interesante para esta actividad enzimática. Durante la 1<sup>a</sup> y la 2<sup>a</sup> campaña, durante los primeros muestreos (abril-mayo) esta enzima muestra una actividad baja y con poca variabilidad entre los tratamientos. Pero en la 3<sup>a</sup> campaña la PEPC del tratamiento control mostró

para esta primera parte del ensayo, altos valores. Las plantas de los otros tratamientos (T2 y T3), reproducen el perfil de las otras dos campañas: baja actividad en abril y mayo y subidas en junio.

También se hace evidente en el análisis estadístico, que el tratamiento térmico de la segunda y la tercera campaña tuvo un efecto significativo en las plantas y que afectó a la actividad de esta enzima. Muestra de ello son las diferencias estadísticamente significativas que se muestran en estas dos campañas entre T1 y T3 para la actividad a pH 8 específica y total (2ª campaña, Fig. 5.15 y 5.16; 3ª campaña, Fig. 5.21 y 5.22).

La evolución de la actividad total también hace evidente las diferencias entre los años agronómicos. En la segunda campaña la actividad total (Fig. 5.16) se mantiene en valores más altos que en la primera (Fig. 5.2) y la tercera (Fig. 5.22), además muestra un claro perfil descendente, mostrando en los últimos muestreos los mínimos para este parámetro en los tres tratamientos. Este perfil descendente a lo largo de los muestreos se mantiene en la tercera campaña pero no en la 1ª, donde la actividad total de esta enzima aumenta en los muestreos de julio.

En cuanto a las medidas de activación de la enzima por fosforilación, cabe destacar que en estos parámetros en las tres campañas hay diferencias significativas entre T1 y T3.

El análisis de los Western revelados con anticuerpos anti-PEPC de plantas, muestran patrones interesantes y novedosos ya que se muestra una enzima más ubiquitinada en la hoja que en las raíces. Estos son los primeros datos obtenidos sobre la monoubiquitinación de la PEPC de la raíz de remolacha y los segundos obtenidos en la literatura científica de monoubiquitinación de la PEPC de raíz (Shane et al., 2013).

La actividad total de la PEPC a pH 8 se correlaciona con la integral térmica, la ETo, la radiación, de forma inversa en las tres campañas mostrando que el desarrollo del cultivo y la presión ambiental disminuyen la actividad total de la PEPC. Esto también lo evidencian las correlaciones inversas encontradas en las tres campañas con parámetros indicadores del estado hídrico de la raíz (%MSR). Durante la primera y la segunda campaña además de con el brix, las correlaciones eran inversas con parámetros como la polarización y la acumulación de azúcares reductores. También es significativa la correlación positiva que presentó a lo largo de las tres campañas con la actividad SS.

Respecto a la actividad a pH 8, durante la primera campaña se encontraron correlaciones positivas con el nitrógeno nítrico en peciolo y las proteínas e inversas con la producción de raíz y las temperaturas. Durante la segunda campaña cabe destacar las correlaciones negativas con la producción de materia seca de hojas y positivas con la producción de hojas y el LAI. Además durante esta segunda campaña hubo correlaciones directas con varias medidas indicadoras de la movilización del nitrógeno en la planta (NJUP, proteínas). Durante la segunda campaña, el proceso de pérdida

foliar que supone una reabsorción de nutrientes y movilización de reservas, implicó a la PEPC de la raíz. Durante la tercera campaña es donde la actividad PEPC muestra un menor número de correlaciones.

Los parámetros de activación con glucosa-6P a pHs subóptimos y la razón entre pH8 y pHs subóptimos, son buenos indicadores del estado de fosforilación de la PEPC de raíz. La respuesta al málico se ha mostrado cambiante en función de la campaña:

- durante la primera campaña, la respuesta concuerda con la bibliografía y los otros dos parámetros,
- en la segunda campaña, la correlación de la inhibición con 1mM con los otros dos parámetros es significativa pero inversa
- durante la tercera campaña se repite el resultado de la correlación inversa con la inhibición a 1 mM de málico pero la correlación es directa con 0,05 mM.

Esto sugiere que las condiciones del golpe de calor bajo plástico activan otros mecanismos de modulación de la actividad PEPC que cambia su sensibilidad al málico.

### 3.5.6. Correlaciones globales de la actividad PEPC a pH8: relaciones con todos los parámetros estudiados en todos los ensayos de campo

Integrando todos los ensayos realizados y todas las campañas, pueden descubrirse patrones de funcionamiento global. Se analizaron las correlaciones de la actividad PEPC en todas las condiciones ensayadas.

La actividad total de la PEPC se correlaciona con la integral térmica (GDIA) de forma inversa, siendo mayor la correlación con los grados día acumulados. Esto muestra una menor actividad total de esta enzima al avanzar la edad del cultivo (Tabla 5.13)

**Tabla 5.13.** Correlaciones entre la actividad PEPC y la integral térmica (GDIA) durante las tres campañas estudiadas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-6}$ . Se indican en negrita las que poseen una  $\text{sign} < 10^{-10}$ .

Variable 1	Variable 2	CP (r)	N
<b>GDÍA6d</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,682</b>	<b>75</b>
<b>GDÍA4d</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,681</b>	<b>75</b>
GDÍA2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,661	75
GDÍA	PEPC-pH8-U/gpf	-0,552	75

La actividad total de la PEPC también muestra correlaciones a nivel global con parámetros agronómicos (Tabla 5.14). Se correlaciona de forma positiva con el nitrógeno en jugo de peciolo, la cantidad de proteína y con la cantidad de potasio. Muestra, como en el caso de SS, correlaciones inversas con los parámetros de producción de materia seca de la raíz y del peciolo, azúcar por hectárea, producción de raíz y el brix. En cambio, la correlación es directa con el sodio y el potasio. También podría indicar que la actividad total de la PEPC en la raíz de la remolacha está relacionada con periodos de crecimiento de la planta disminuyendo su actividad en periodos acumulativos.

**Tabla 5.14.** Correlaciones entre la actividad PEPC y los parámetros agronómicos y metabólicos durante las tres campañas estudiadas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídricos y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-5}$ . Se indican en negrita las que poseen una  $\text{sign}<10^{-9}$ .

Variable 1	Variable 2	CP(r)	N
NNJUP	PEPC-pH8-U/gpf	0,631	52
<b>ProdMSR</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,631</b>	<b>77</b>
ProdMSPI	PEPC-pH8-U/gpf	-0,559	76
<b>Az/Ha</b>	<b>PEPC-pH8-U/gpf</b>	<b>-0,624</b>	<b>79</b>
ProdR	PEPC-pH8-U/gpf	-0,606	82
RPotasio	PEPC-pH8-U/gpf	0,584	80
RSodio	PEPC-pH8-U/gpf	0,548	80
BRIX	PEPC-pH8-U/gpf	-0,506	83
Proteína	PEPC-pH8-U/gpf	0,636	75

En los parámetros climáticos, tabla 5.15, también encontramos correlaciones con la actividad total de la PEPC a pH 8. Se muestra una correlación inversa con la ETo, que presenta en la acumulada de 4 días su mayor coeficiente de correlación,  $r = -0,578$ . La temperatura media y la mínima también se correlacionan de forma inversa con la actividad PEPC. Las humedades relativas máxima y media se correlacionan de forma positiva con esta actividad. La actividad total de la PEPC disminuye en situaciones de altas temperaturas y déficit hídrico.

**Tabla 5.15.** Correlaciones entre la actividad PEPC y los parámetros ambientales durante las tres campañas estudiadas. Para las correlaciones se han tenido en cuenta los datos de los ensayos térmicos, hídrico y microtúneles. CP: Coeficiente de Pearson; N: n° de datos. Todas las correlaciones tienen una significación  $<10^{-5}$ .

Variable 1	Variable 2	CP(r)	N
EToC	PEPC-pH8-U/gpf	-0,509	75
EToC2d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,568	75
EToC4d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,578	75
EToC6d	PEPC-pH8-U/gpf	-0,559	75
TªMEDIA	PEPC-pH8-U/gpf	-0,564	75
TªMIN	PEPC-pH8-U/gpf	-0,519	75
HRMAX	PEPC-pH8-U/gpf	0,543	59
HRMEDIA	PEPC-pH8-U/gpf	0,5081	75

### **3.6. MICROTÚNELES: INFLUENCIA DEL ESTADO DE DESARROLLO EN LA RESPUESTA AL GOLPE DE CALOR**

---

Finalmente para completar el estudio de la repercusión de los golpes de calor en la remolacha, se estudió el efecto del golpe de calor en relación con el estado de desarrollo del cultivo. Este ensayo se realizó en las dos últimas campañas. Esto fue posible mediante la instalación de microtúneles portátiles (se les denominó microtúneles en relación al tamaño menor, 4x4x2 m, de los túneles utilizados respecto al utilizado en los estudios anteriores). En la figura 6.1A se muestra la colocación de estas estructuras para obtener las tres repeticiones de cada fecha de ensayo y la localización de las muestras control. Los microtúneles se instalaron anexos a los ensayos de túneles y déficit hídrico, en sistemas de riego 100% ETc, sin restricción por tanto del aporte hídrico, durante cortos periodos de tiempo (2 semanas) y después se retiraron. Durante el tiempo en que estuvieron puestos (estructuras cerradas de plástico) se consiguieron incrementos de  $T^a$  respecto del exterior de hasta 8 °C, alcanzándose  $T^a$  de hasta 48 °C.

#### **3.6.1. Resultados del ensayo de microtúneles durante la segunda campaña (2004-2005)**

---

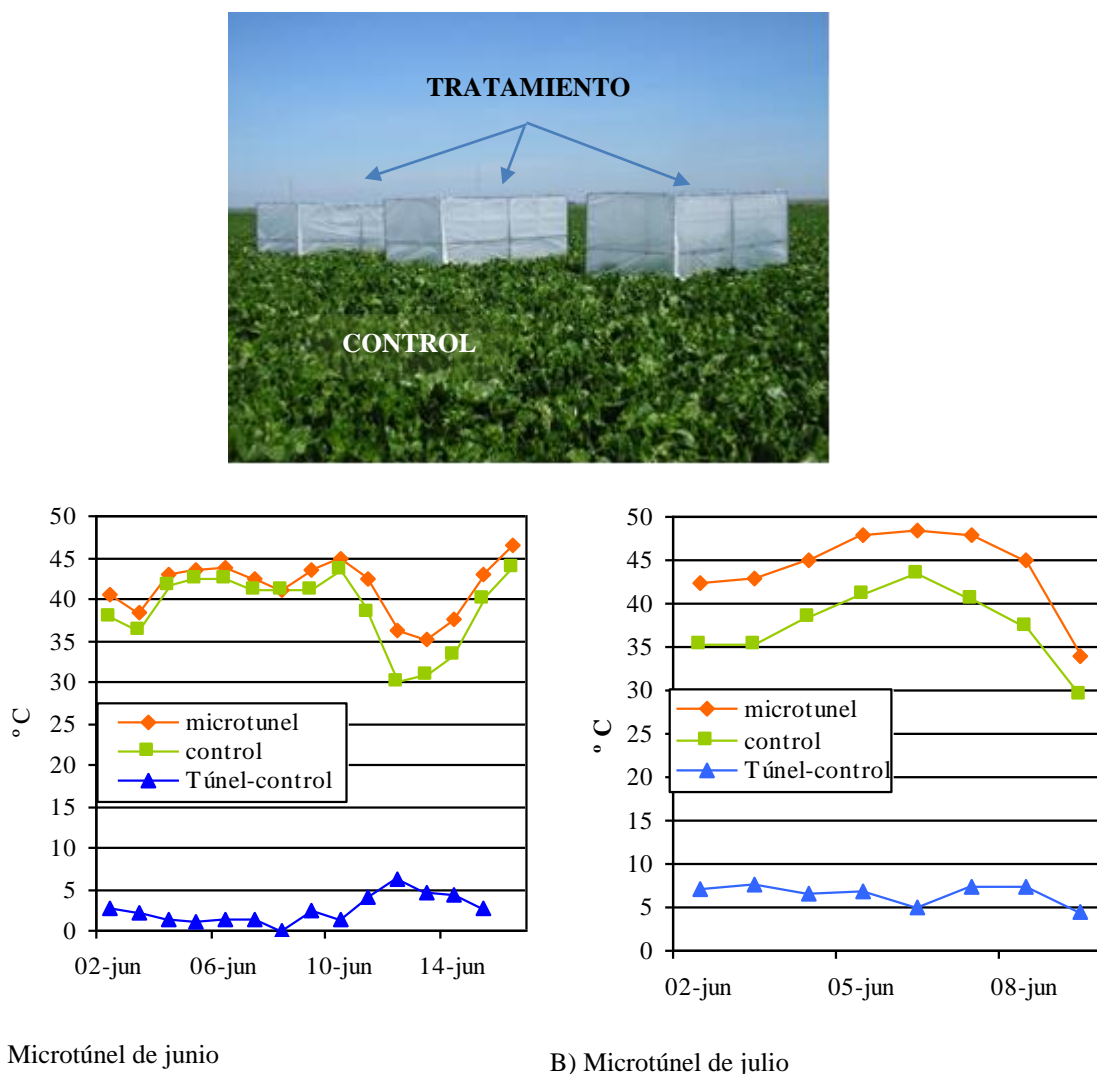
Los registro de  $T^a$  de los microtúneles se presentan en la figura 6.1. Se muestran las  $T^a$  del control (parcela de terreno sin cubrir al lado del microtúnel) y las temperaturas del microtúnel (parcela cerrada por estructura plástica). Se han considerado 2 situaciones de ensayo durante la campaña del 2005 (2ª campaña):

- Golpe de calor en abril (túnel grande). Estos datos corresponden a los datos de la segunda campaña analizada en el capítulo 3.1 en la figura 2.6 y se han tomado como representativos de la respuesta de la planta al golpe de calor en fecha en que la planta se encuentra en pleno crecimiento (se toman para su análisis en este capítulo la fecha del 18 de abril del control T1 y del tratamiento T3).
- Golpe de calor en junio (microtúnel 1), cuando está aumentando la cantidad de sacarosa.
- Golpe de calor en julio (microtúnel 2), momento en que la pérdida de agua aumenta la riqueza en sacarosa y recolección.

De los microtúneles 1 y 2 se recogieron muestras tras 15 días de tratamiento y simultáneamente se tomaban las muestras control de las plantas de la parcela cercanas a las estructuras de los microtúneles pero en el exterior sin cubrir. También se tomaron muestras en las fechas de recolección del cultivo (22 de julio).

Los datos recogidos de los microtúneles se compararon con los muestreos de T1 (parcela control) y T3 (parcela cubierta con túnel grande y cerrado correspondiente al ensayo térmico de la

segunda campaña, descrito en el capítulo 3). La comparación con el golpe de calor de abril permite comparar los datos de junio y julio con los de abril, momento en que las remolachas son más jóvenes y se encuentra en pleno crecimiento.



**Figura 6.1.** Disposición de los microtúneles para los tratamientos de golpes de calor de 15 días y de las plantas utilizadas como control. De cada estructura se recogía una planta para tener tres repeticiones independientes. Evolución de las temperaturas máximas en el interior y en el exterior en las dos fechas que se llevaron a cabo los ensayos con microtúneles (junio, A; y, julio, B). (-♦-) T<sup>a</sup> máxima en el interior de los microtúneles; (-■-) T<sup>a</sup> máxima en el exterior, parcela control; (-▲-) Incrementos de temperatura alcanzados (T<sup>a</sup> máxima en el microtúnel menos la T<sup>a</sup> máxima en el exterior).

En los microtúneles 1 y 2 se determinaron los parámetros de contenido en glucosa, actividades enzimáticas de hidrólisis de sacarosa y niveles de prolina.

En cuanto a la **glucosa** (Fig. 6.2), los ensayos con microtúneles presentan mayores diferencias en función de la fecha del cultivo que entre control y tratamiento. Aunque las parcelas tratadas tienen valores ligeramente superiores, estas diferencias no son significativas. Sí que fueron relevantes las diferencias entre los valores de junio y julio tanto de los controles como de las parcelas tratadas. Los

valores de glucosa del golpe de calor del muestreo del 18 de abril (capítulo 3.2, Fig. 2.4) son mayores que los registrados en el ensayo de los microtúneles (0,44 g/100gpf para el control y 0,47 g/100gpf para el tratamiento) y las diferencias entre el control y el tratamiento si fueron significativas (sign.< 0,05).

En la actividad **sacarosa sintasa** (Fig. 6.3 A y B), se aprecia un incremento de actividad en las parcelas tratadas, siendo esa diferencia mayor cuando el microtúnel se instaló en julio. Comparando estos valores con los de abril, los valores de actividad SS total de los microtúneles fueron menores que los valores de actividad SS de los túneles de los experimentos de abril recogidos en el capítulo 3.2. Mientras que en los ensayos de microtúneles se obtuvieron valores máximos de 1,8 U/gpf en julio, en el golpe de calor de abril fueron de 2 U/gpf para el control y 2,3 U/gpf para el tratamiento T3 (capítulo 3.2, Fig. 2.6 A, 2º muestreo, diferencia significativa entre control y T2 <0,05).

Los resultados muestran que la actividad sacarosa sintasa total aumenta en respuesta a los golpes de calor independientemente de la fecha en que se produzca el incremento de Tª. Este aumento es significativo en el golpe de abril (sign.<0,01) y en el de junio (sign.<0,05). Las diferencias en los microtúneles no fueron significativas entre el control y el tratamiento, cuando la actividad se expresó como actividad específica (Fig. 6.3 B y capítulo 3.2 Fig. 2.6 B).

La **actividad invertasa neutra** (Fig. 6.3 C) muestra diferentes comportamientos frente al estrés térmico en función de la fecha muestreada. En el caso de la actividad total, en el muestreo de junio la actividad enzimática aumenta con el tratamiento y en el muestreo de julio la actividad disminuye. En este último caso existe diferencia significativa entre el control y el tratamiento (sign.<0,05). En el caso del golpe de calor de abril, el control presenta 0,04 U/gpf y el tratamiento T3 0,09 U/gpf (capítulo 3.2 Fig. 2.6 C, 2º muestreo) aumentando el golpe de calor la actividad invertasa, con diferencia significativa entre ellos (sign.<0,001). La diferencia entre control y tratamiento en cuanto a la actividad invertasa total, es más importante en el muestreo de abril que en los de junio y julio. La actividad específica (6.3 D) reproduce prácticamente este patrón. Vuelve a ser el golpe de calor de abril el que más diferencia presenta entre control y tratamiento T3 (control=0,018 U/mgp y tratamiento=0,04 U/mgprot, capítulo 3.2, Fig. 2.6 D, 2º muestreo), con diferencia significativa entre ellos (sign.<0,01). De nuevo el golpe de calor de julio invierte el resultado, disminuyendo la actividad invertasa de forma significativa (<0,05) tras el golpe de calor (Fig. 6.3 D).

La **actividad invertasa ácida** disminuye tras los golpes de calor de junio y julio, y aumenta tras el de abril (Fig. 6.3 E y F) en la actividad total y en la específica. Los valores de junio son ligeramente superiores a los de los registros tras el golpe de calor de abril, que fueron 0 para el control y 0,011 U/gpf para el tratamiento T3 (capítulo 3.2, Fig. 2.6 E). En el caso de la actividad específica también se registraron valores de 0 para el control y 0,005 U mg<sup>-1</sup> prot para el tratamiento (capítulo



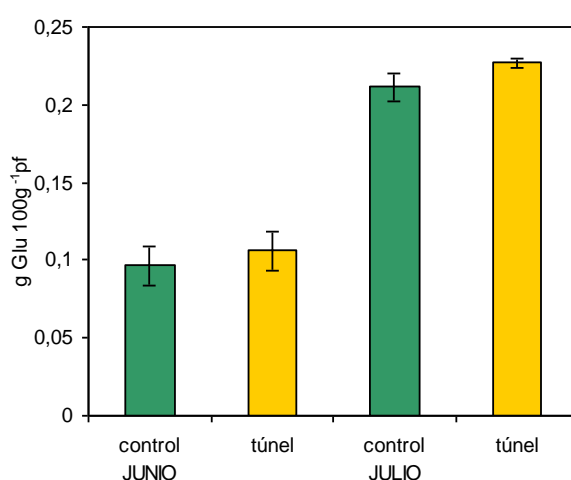
3.2, Fig. 2.6 F). Ninguna de las fechas muestra diferencias significativas entre control y tratamiento debido a la gran dispersión de los datos.

Finalmente se determinaron los **niveles de prolina** en los diferentes órganos (Fig. 6.4). Estos datos revelan que el contenido de este osmolito en las hojas aumenta ligeramente con los golpes de calor (Fig. 6.4, túnel). En las raíces, el golpe de junio hace aumentar su contenido y el de julio lo disminuye respecto al control.

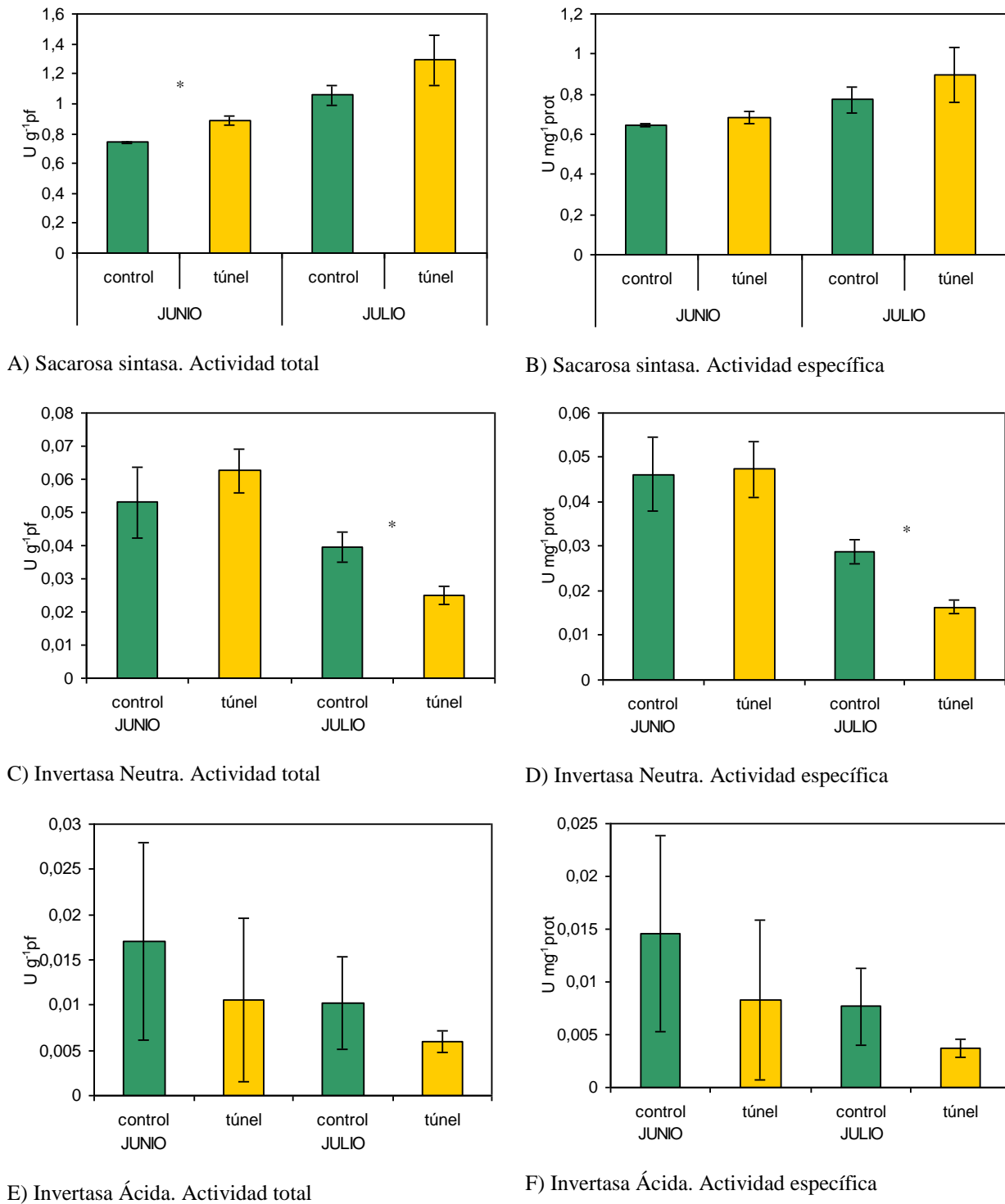
Para ver el efecto de los golpes de calor propiciados por los microtúneles en los valores agronómicos a fecha de recolección, se compararon los valores agronómicos de las remolachas de los microtúneles y del túnel de abril (túnel grande) en recolección. Los valores se muestran en la Tabla 6.1.

El golpe de calor de abril produce un impacto mucho mayor en el cultivo en cuanto a producción, que cae fundamentalmente por la falta de crecimiento de las plantas del túnel y por un leve descenso en la polarización.

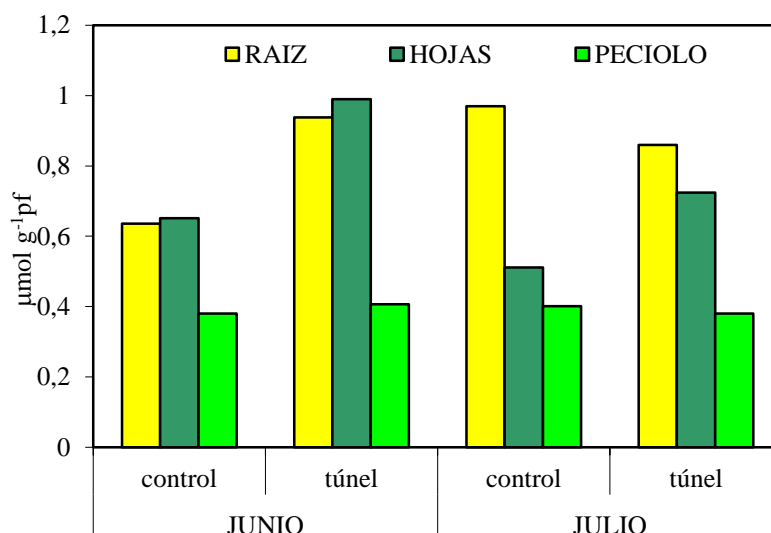
Estos datos revelan que cuando la planta ha concluido su crecimiento vegetativo y en parcelas bien regadas con buena disponibilidad hídrica donde se ha producido un periodo de aclimatación a altas temperaturas, los golpes de calor no desencadenan respuestas en la planta que puedan influir en la calidad o la cantidad de sacarosa producida. La planta es capaz de aclimatarse y superar esta situación. En cambio, cuando el golpe de calor se produce en la época de crecimiento, los mecanismos para conseguir la supervivencia acarrearán importantes consecuencias en la producción.



**Figura 6.2.** Contenido en glucosa de las raíces en los ensayos con microtúneles. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. (■) Control; (■) Microtúnel. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



**Figura 6.3.** Evolución de las actividades enzimáticas encargadas de la degradación de la sacarosa en los ensayos con microtúneles. A) SS total; B) SS específica; C) IN Total; D) IN específica; E) IA total; F) IA específica. (■) Control; (■) Microtúnel. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre tratamientos explicadas en el texto.



**Figura 6.4.** Medidas de prolina en los distintos órganos en los ensayos con microtúneles. (■) Raíz; (■) Hoja; (■) Pecíolo.

**Tabla 6.1.** Datos de recolección. Se muestra con (\*) las diferencias significativas. GC; se refiere a Golpe de Calor. 1, 2 y 3 se refieren 1 al muestreo de abril del túnel grande, 2 muestreos de junio en microtúneles, 3 muestreos de julio en microtúneles. Las abreviaturas de los datos agronómicos se recogen en el apartado de Abreviaturas.

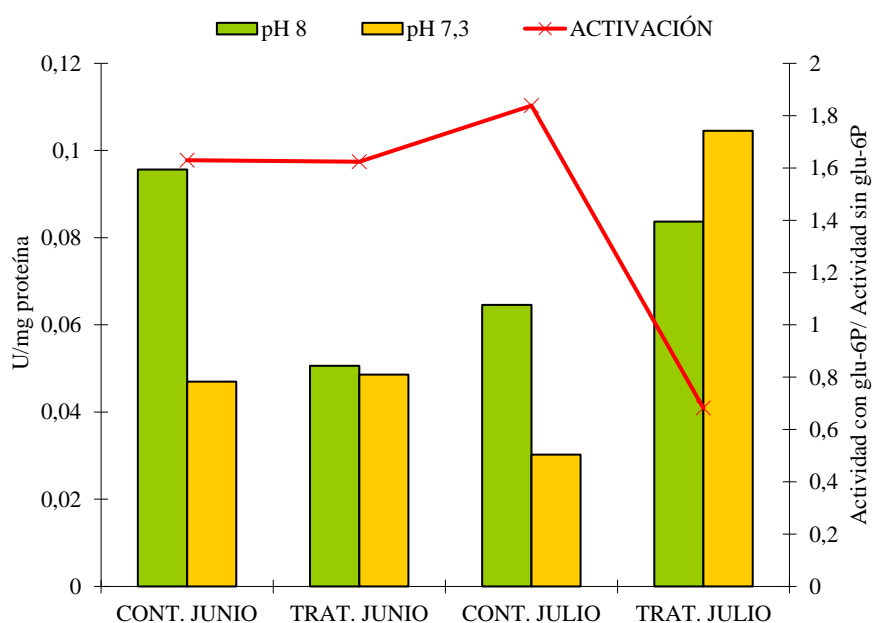
	GC1. Túnel Grande Abril		GC2. Microtúnel Junio		GC3. Microtúnel Julio	
	control	tratamiento	control	tratamiento	control	tratamiento
PRODUCCIÓN (Tm/Ha)	99.8	40.0*	93	92	88	91
POLARIZACIÓN (%)	17.6	16.03	18.5	18.87	18	18
α-AMINOS (mmol/100 gpf)	1.31	1.69*	1.02	1.04	1.19	0.83*
POTASIO (mmol/100 gpf)	5.15	5.9*	5.28	5.12	5.1	4.88
SODIO (mmol/100 gpf)	1.04	1.91	0.85	0.74	1.14	0.73
AZ. RED. (%)	0.2	0.27	0.16	0.23*	0.29	0.15
IEA	113.56	39.71*	113	115	106	110

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) tienen un papel en el mantenimiento de la proporción C/N de la planta (Chollet et al. 1996). En estos ensayos hemos determinado la actividad PEPC a pH óptimo de 8 y subóptimo de 7,3, la activación por su activador alostérico la G6P y la relación entre la actividad a pH óptimo y subóptimo, todos ellos parámetros que evidencian modificaciones postraduccionales en la PEPC como la fosforilación o la monoubiquitinación. En la figura 6.5 se muestra la actividad específica ( $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$ ) a pH8 y a pH 7,3. La línea roja marca los valores de activación de la PEPC en presencia de G6P (Actividad en presencia de G6P/ Actividad en ausencia de G6P). Hay que señalar que menores

diferencias entre la actividad a pH 8 y pH7,3 así como valores bajos en la activación de la enzima por G6P, sugieren que la enzima está en su forma fosforilada. Analizando la respuesta de la actividad óptima a pH 8, esta disminuye tras el tratamiento en el ensayo de junio y aumenta en el de julio respecto del control. En el golpe de calor de abril (capítulo 3.5, Fig. 5.15) hay muy poca diferencia en la actividad a pH 8 entre el control ( $0,092 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot}$ ) y el tratamiento ( $0,111 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot}$ ). La actividad a pH 8 hace referencia a la cantidad de la enzima, sin embargo para ver si esa enzima está más o menos activada *in vivo* analizaremos la relación de la actividad a los dos pHs y la activación por G6P.

La diferencia entre la actividad a pH 8 y pH7,3 es muy alta en el control de junio y en el de julio y baja en los tratamientos. Estos resultados indicarían que la enzima está mas desfosforilada en las condiciones control y que se fosforila con el aumento de temperatura debajo de los microtúneles. Esto vendría apoyado, en el caso del tratamiento de julio, por una bajada en los valores de activación por G6P, que también indicarían mayor grado de fosforilación de la PEPC en el tratamiento de julio (Fig. 6.5, valores representados en la línea roja).

Estos datos en su conjunto muestran que en las condiciones de este ensayo, el golpe de calor en julio produce el aumento de la fosforilación de la PEPC de raíz.

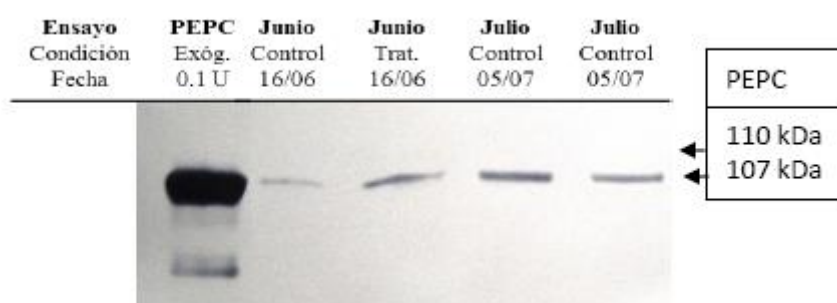


**Figura 6.5.** Actividad específica de la PEPC a pH8 (■), a pH7,3 (■) y medida de la activación con G6P a pH 7,3 (—) en los microtúneles de junio (1) y julio (2).

Recientemente se ha puesto en evidencia una nueva modificación postraduccional de la PEPC, además de la ya mencionada por fosforilación. Esta modificación postraduccional es una monoubiquitinación que consiste en la adición de una molécula de monoubiquitina en la Lys 624

(Ruiz-Ballesta et al. 2014). La respuesta de una PEPC purificada de semilla de sorgo muestra que la monoubiquitinación aumenta la sensibilidad al malato, sin embargo, el mismo experimento realizado en extractos crudos de semillas indica que la monoubiquitinación hace lo contrario, disminuyendo la sensibilidad al efector negativo. En este apartado hemos comprobado si la PEPC de raíces de remolacha está sometida a esta modificación postraduccional. Para ello se han analizado los extractos crudos de los ensayos de golpes de calor de abril (analizados en el capítulo 3.5) y los de remolachas de los tratamientos de los microtúneles.

La Figura 6.6 muestra el Western blot de los extractos crudos de los diferentes tratamientos analizados en electroforesis desnaturalizante (10% de acrilamida), transferidos a una membrana de nitrocelulosa revelada con anticuerpos antiPEPC. Los anticuerpos revelan una cantidad y un patrón similar entre los controles y los tratamientos con golpe de calor, independientemente de que los muestreos se realizaran en junio o julio (Fig. 6.6). Tampoco se observan en estos muestreos la banda de PEPC de 110 kDa que representan la versión monoubiquitinada de la enzima (Ruiz-Ballesta et al. 2014).

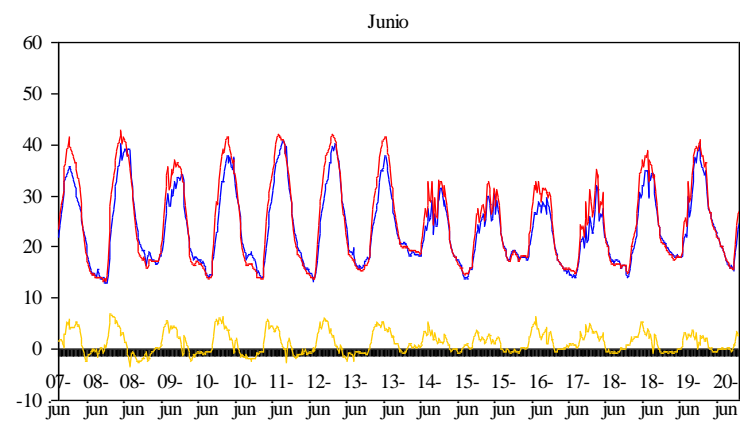
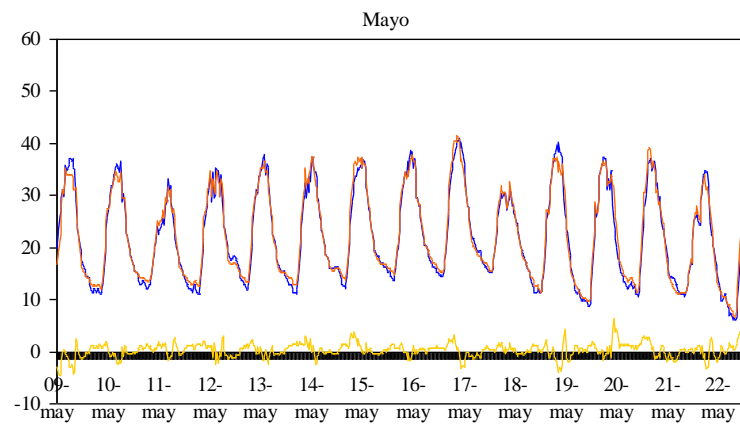
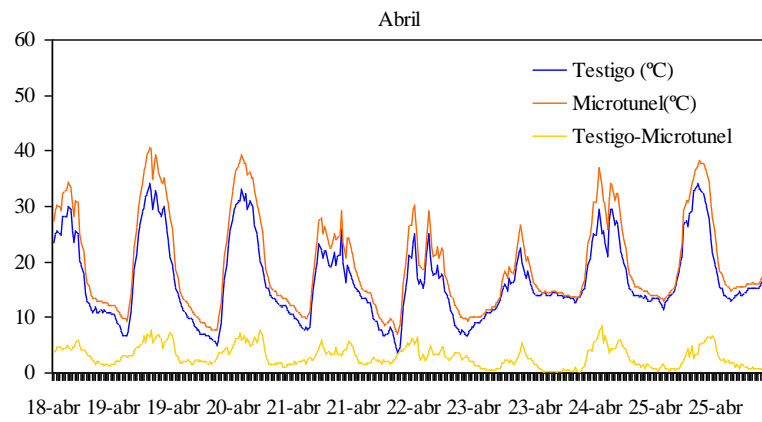


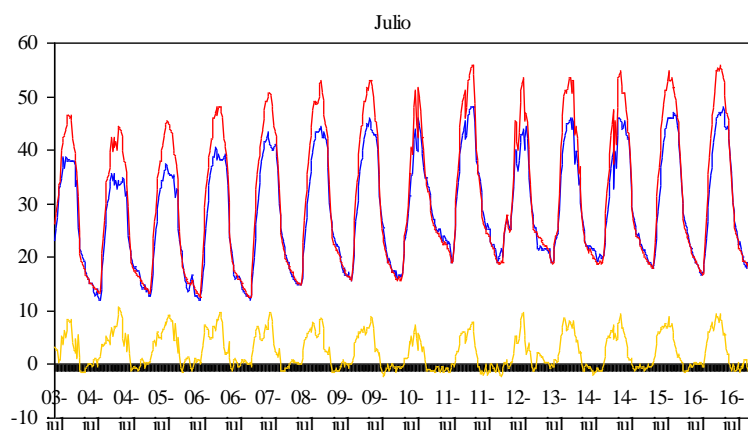
**Figura 6.6.** Resumen de los westerns realizados en los golpes de calor del 2005. Junio: Primer golpe de calor con microtúneles; Julio: Segundo golpe de calor con microtúneles. La condición Control es fuera de los túneles, la condición tratamiento (Trat.) en el interior de los túneles. Las pistas de junio y de julio se cargaron con 0.002 U. El Western fue revelado con anticuerpos antiPEPC de plantas.

### 3.6.2. Resultados del ensayo de microtúneles durante la tercera campaña (2005-2006)

En vista de las diferencias detectadas en la campaña anterior en función del momento de desarrollo de las plantas (abril, junio y julio), durante esta tercera campaña se repitieron los ensayos de los microtúneles pero esta vez se instalaron microtúneles en cuatro fechas diferentes (abril, mayo, junio y julio). En la figura 6.9 se muestran los registros de temperatura tomados por los detectores HOBOs colocados en el ensayo. Se presentan las temperaturas del control (Testigo), microtúnel (Microtúnel), y la diferencia entre las temperaturas de la parcela testigo menos la del microtúnel (Testigo – Microtúnel). Los incrementos de temperatura respecto al exterior alcanzaron distintos

valores en función del mes de colocación del microtúnel (Testigo – microtúnel: 8.5 °C en abril, 6 °C en mayo, 7 °C en junio, 11 °C en julio.





**Figura 6.9.** Registro de las temperaturas alcanzadas en el exterior (testigo) y en el interior (microtúnel) de los microtúneles para las cuatro fechas ensayadas. La línea amarilla muestra la diferencia entre la temperatura del microtúnel y la exterior ( $T^a$  Microtúnel-  $T^a$  Control).

### 3.6.2.1. Parámetros agronómicos estudiados en los ensayos de microtúneles en la 3ª campaña

Para determinar los parámetros agronómicos se tomaron muestras justo después de quitar el microtúnel (efecto inmediato) y se recolectó un 10% de la parcela, dejando el resto para su recolección posterior, en la fecha de recolección del cultivo que fue en julio. En la tabla 6.2. se muestran los parámetros agronómicos que presentaron diferencia significativas entre el control y el tratamiento justo tras el golpe de calor (efecto inmediato). En este efecto inmediato se observa que cuanto antes era recibido el golpe de calor (abril), más parámetros se alteraban entre el testigo y el microtúnel (Tabla 6.2). En julio no se presentan diferencias entre las remolachas control y las del tratamiento. Puede observarse que el efecto inmediato sobre las plantas de una subida de temperatura durante 15 días en abril (fase más joven de la remolacha) repercute en una disminución de al menos 5 parámetros agronómicos. Entre ellos, el golpe de calor produce una disminución del brix y de la materia seca de la raíz (PORMSR). Estos dos parámetros aumentan en el caso de estrés hídrico (capítulo 3.4, Tabla 4.4, Riego Restringido) cuando el estrés hídrico se produce también en el momento de crecimiento. Esto indica que los estreses de temperatura e hídrico afectan de forma diferente a los parámetros agronómicos. A lo largo del capítulo 3.4 se mostraron las relaciones entre los distintos parámetros que indican el estado hídrico de la planta. El brix de la raíz y el porcentaje de materia seca de la raíz están relacionados con la prolina y con situaciones de déficit hídrico. La falta de riego aumenta la prolina de la raíz, el brix de la raíz y el porcentaje de materia seca de la raíz (Fig. 4.1, Fig. 4.4, Tabla 4.4 ). El valor porcentaje de materia seca de raíz (PORMSR) y el valor de materia seca soluble (BRIX), se afectaron también en el tratamiento de mayo (Tabla 6.2). En este tratamiento, se afectó también de forma significativa la polarización de la raíz (RPOL), valor agronómico de gran interés y relacionado con el contenido en sacarosa de la raíz (Tabla 6.2). En el

muestro de junio, en el que la raíz está ya bastante desarrollada y prácticamente completando sus niveles de sacarosa, solo se encontraron variaciones en los niveles de nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz (RAAMINO), parámetro relacionado con el contenido y la metabolización del nitrógeno. La disminución de este parámetro también puede considerarse un efecto contrario al que produce el estrés hídrico, ya que durante la primera y la segunda campaña se realizaron ensayos de déficit hídrico en los que se midió en recolección (junio-julio), entre otros parámetros la cantidad de  $\alpha$ -aminos (datos no mostrados). Este parámetro siempre mostraba mayores valores en secano, con diferencias estadísticamente significativas respecto a al riego (3,48 mmol/100 gpf en secano frente a 2,41 en riego durante la 1ª campaña; 2,96 mmol/100 gpf en secano frente a 1,4 en riego durante la 2ª campaña). Este aumento en déficit hídrico del nitrógeno  $\alpha$ -amino también ha sido descrito en estudios anteriores de comparación de variedades (Morillo-Velarde et al. 2005).

En su conjunto, estos resultados muestran que en los parámetros agronómicos se hace evidente que el efecto inmediato del golpe de calor es más significativo cuando se produce en etapas tempranas del desarrollo y que la modificación de algunos parámetros agronómicos por tratamiento con alta temperatura puede producir efectos inversos a los producidos por tratamientos de estrés hídrico.

**Tabla 6.2.** Efecto inmediato de los microtúneles sobre los parámetros agronómicos. Se han presentado los parámetros para los que aparece diferencia significativa entre control y tratamiento. Las temperaturas representan las medias de las máximas del testigo y del interior del microtúnel. Media $\pm$ EE de 3 repeticiones. Entre paréntesis: Tª media del Testigo y del microtúnel respectivamente. Análisis mediante t-test.

Fecha	Parámetro	Testigo	Microtunel	Sig <sup>*</sup>
<b>Abril</b> (28.1 °C/ 32.7 °C)	PRODR	58.00 $\pm$ 2.00	43.43 $\pm$ 3.68	0.025
	PBRIX	5.54 $\pm$ 0.01	4.48 $\pm$ 0.18	0.018
	PORMSR	19.30 $\pm$ 0.19	17.70 $\pm$ 0.52	0.046
	BRIX	17.00 $\pm$ 0.15	15.27 $\pm$ 0.27	0.005
	HOJAS/P	25.80 $\pm$ 0.66	20.50 $\pm$ 0.40	0.002
<b>Mayo</b> (33.6 °C/ 37.4 °C)	PORMSR	22.84 $\pm$ 0.44	21.03 $\pm$ 0.07	0.015
	BRIX	22.07 $\pm$ 0.39	19.83 $\pm$ 0.07	0.005
	RPOL	17.55 $\pm$ 0.35	14.40 $\pm$ 0.10	0.002
<b>Junio</b> (34.9°C/ 37.8 °C)	AAMINO	0.68 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.05	0.031
<b>Julio</b> (42.74 °C/ 50.1 °C)	-	-	-	-



La tabla 6.3 muestra diferencias entre bastantes parámetros agronómicos, ej. en las cuatro fechas se observa una disminución de la producción, de la polarización, alfa-aminos, sodio e IEA en las plantas que sufrieron el golpe de calor (sombreado en naranja). Esta tendencia en todas las fechas no muestra, sin embargo, diferencias significativas en el análisis estadístico realizado de forma individual. Para comprobar si esta tendencia general se podía considerar como un hecho global, se realizó una comparación entre los datos de los controles y los microtúneles reagrupando los datos de las cuatro fechas. Cuando se analizan los datos reagrupados se observa que sea cual sea la fecha del tratamiento con el microtúnel, este tiene efectos en recolección (Fig. 6.4) con una disminución de la biomasa total (PROD) y de la polarización (POL) entre otros parámetros (Tabla 6.4). Parece que se produce una inhibición del crecimiento, posiblemente por las limitaciones en la fotosíntesis que impone el aumento de temperatura. Finalmente, los golpes de calor no afectaron a la calidad del jugo (no hay variación significativa en el contenido en azúcares reductores ni en el % VTIR).

**Tabla 6.3.** Efecto de los microtúneles en los parámetros agronómicos en recolección para cada fecha de tratamiento. Las abreviaturas están desarrollados en el apartado de Abreviaturas. Se han marcado en naranja aquellos parámetros que disminuyen en el microtúnel respecto al control en todas las fechas. En verde se han marcado los parámetros que disminuyen en el microtúnel respecto al control en más de una fecha. Media $\pm$ EE de 3 repeticiones. Análisis mediante t-test.

<b>Abril</b>	PROD	POL	AAMINO	POTASIO	SODIO	AZRED	IEA	VTIR
Testigo	102.8 $\pm$ 2.1	19.8 $\pm$ 0.1	0.99 $\pm$ 0.05	4.91 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.01	133.4 $\pm$ 2.5	89.56 $\pm$ 0.22
Microtúnel	83.9 $\pm$ 6.4	19.6 $\pm$ 0.1	0.94 $\pm$ 0.03	4.97 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.01	108.2 $\pm$ 8.0	89.71 $\pm$ 0.14
Sig.	0.082	0.130	0.492	0.430	0.374	0.678	0.081	0.671

<b>Mayo</b>	PROD	POL	AAMINO	POTASIO	SODIO	AZRED	IEA	VTIR
Testigo	99.8 $\pm$ 3.3	19.9 $\pm$ 0.1	0.89 $\pm$ 0.03	4.82 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.00	130.3 $\pm$ 4.5	89.84 $\pm$ 0.05
Microtúnel	94.7 $\pm$ 2.2	19.7 $\pm$ 0.1	0.85 $\pm$ 0.08	4.76 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	122.8 $\pm$ 2.9	89.95 $\pm$ 0.18
Sig.	0.432	0.370	0.512	0.791	0.854	0.199	0.387	0.512

<b>Junio</b>	PROD	POL	AAMINO	POTASIO	SODIO	AZRED	IEA	VTIR
Testigo	105.9 $\pm$ 5.3	20.1 $\pm$ 0.3	0.96 $\pm$ 0.03	4.81 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01	138.9 $\pm$ 6.1	89.85 $\pm$ 0.12
Microtúnel	97.0 $\pm$ 5.4	19.6 $\pm$ 0.1	0.87 $\pm$ 0.09	4.72 $\pm$ 0.14	0.62 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.00	125.1 $\pm$ 7.1	89.85 $\pm$ 0.19
Sig.	0.435	0.202	0.520	0.435	0.099	0.742	0.342	0.965

<b>Julio</b>	PROD	POL	AAMINO	POTASIO	SODIO	AZRED	IEA	VTIR
Testigo	100.1 $\pm$ 1.8	20.0 $\pm$ 0.0	0.95 $\pm$ 0.02	5.02 $\pm$ 0.13	0.77 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.01	131.2 $\pm$ 2.3	89.77 $\pm$ 0.11
Microtúnel	93.0 $\pm$ 9.7	19.7 $\pm$ 0.3	0.79 $\pm$ 0.07	4.72 $\pm$ 0.09	0.70 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.00	120.2 $\pm$ 11.8	89.93 $\pm$ 0.19
Sig.	0.502	0.430	0.086	0.118	0.458	0.270	0.404	0.423

**Tabla 6.5.** Efecto de los microtúneles en recolección reagrupando las cuatro fechas de ensayo y eliminando el factor fecha. Entre paréntesis se muestra el EE. Se muestran coloreados los parámetros que muestran diferencias significativas entre control y tratamiento y en la significación se han marcado las que presentan importancia estadística: (\*) sign.<0,05; (\*\*) sign.<0,01. Análisis mediante t-test.

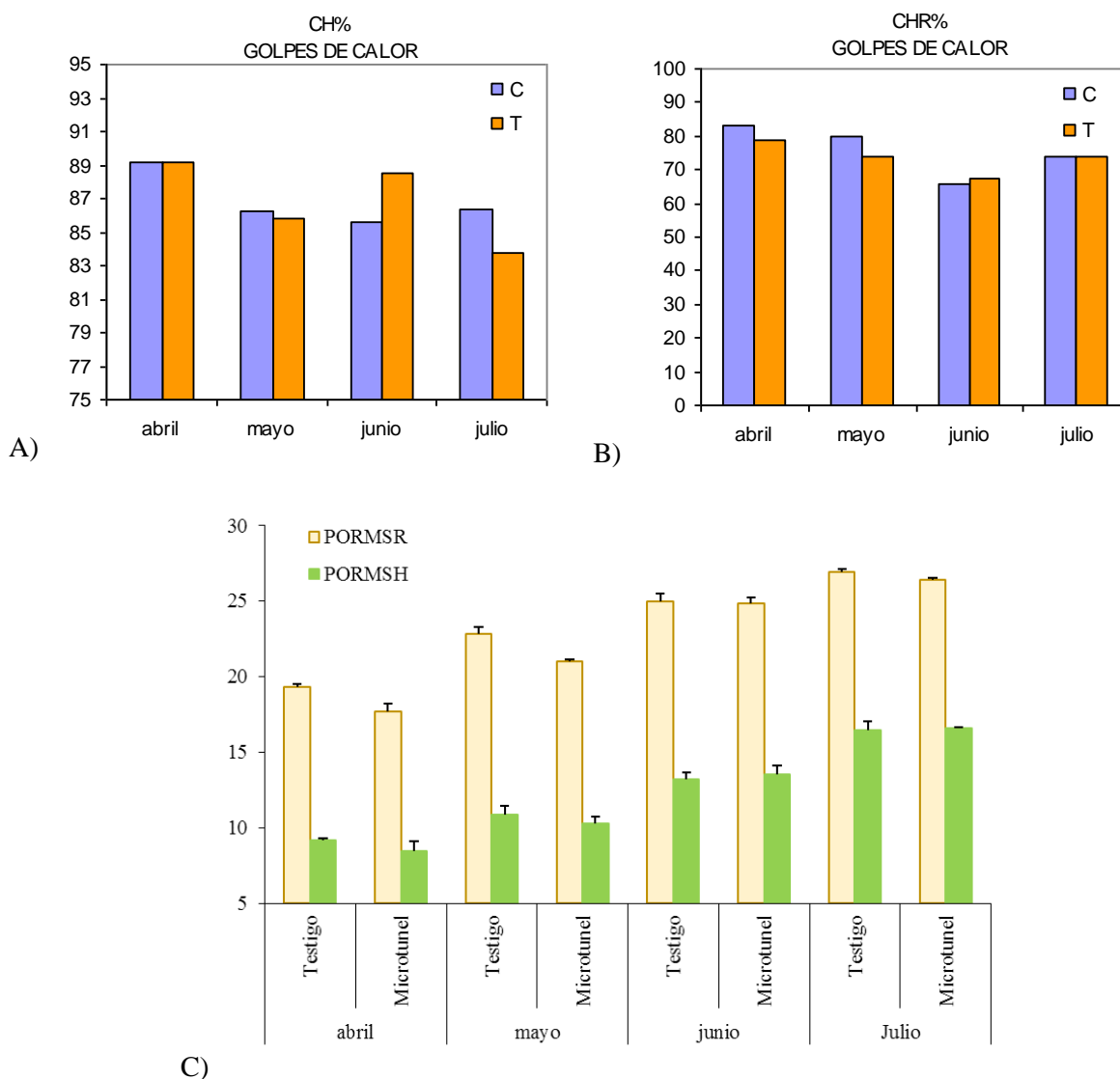
	PROD t/ha	POL % PF	AAMINO mmol/100grPF	POTASIO mmol/100grPF	SODIO mmol/100grPF	AZRED %PF	IEA t/ha	VTIR %
<b>Testigo</b>	102.1 (1.6)	20.0 (0.1)	0.95 (0.02)	4.89 (0.05)	0.73 (0.02)	0.19 (0.00)	133.4 (2.0)	89.76 (0.07)
<b>μtunel</b>	92.1 (3.1)	19.7 (0.1)	0.86 (0.03)	4.79 (0.06)	0.66 (0.02)	0.19 (0.00)	119.1 (4.0)	89.86 (0.08)
<i>Sig.</i>	<i>0.017*</i>	<i>0.018*</i>	<i>0.031*</i>	<i>0.178</i>	<i>0.048*</i>	<i>0.709</i>	<i>0.008**</i>	<i>0.230</i>

### 3.6.2.2. Parámetros fisiológicos estudiados en los ensayos de microtúneles de la 3ª campaña

A continuación se muestran los valores de los parámetros fisiológicos estudiados en esta ensayo de microtúneles para propiciar golpes de calor en los diferentes momentos de crecimiento de la remolacha de abril, mayo, junio y julio.

Durante esta campaña se midió el contenido hídrico y el contenido hídrico relativo de las hojas en las cuatro fechas. La figura 6.10 muestra estos parámetros junto con el % de materia seca de hojas y raíces que también indican el estado hídrico de la planta. En cuanto al contenido hídrico, no se aprecian diferencias entre los controles (C) y los tratamientos (T) de abril y mayo (Fig. 10). En junio, el tratamiento con el microtúnel produjo un aumento del contenido hídrico de la hoja y en julio una disminución. Al observar los valores de contenido hídrico relativo, el golpe de calor en abril y mayo disminuye ligeramente el CHR de la hoja, pero no cambia en junio y julio. También se muestran los valores del % de materia seca y de raíz que dan también una idea del estado hídrico de los tejidos. En la figura 6.10 C, se muestra que el golpe de calor afectó ligeramente al porcentaje de materia seca de hojas y de raíces en las muestra de abril y mayo, no viéndose afectados los valores de junio y julio. En general, una disminución de la materia seca se correlaciona a la inversa con el contenido hídrico del órgano, por los que una disminución de la materia seca en las hojas y raíces de los muestreos de abril y mayo indicarían mayor contenido hídrico en las remolachas de los tratamientos. En cualquier caso las diferencias encontradas son pequeñas y no son significativas. Además, los datos de contenido hídrico de las plantas indican que el estado hídrico de las remolachas de los tratamientos y de los controles es muy similar en casi todos los muestreos o, en su caso, las

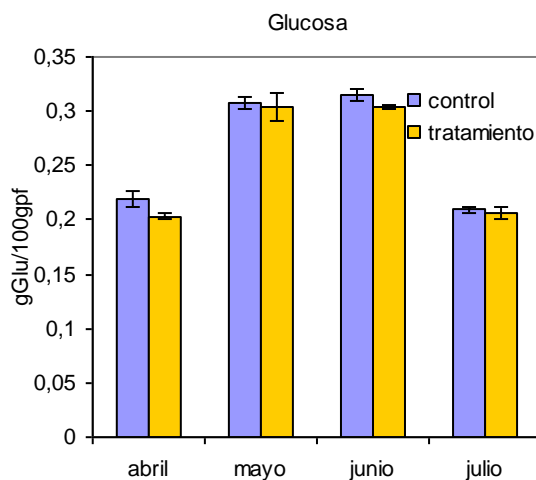
diferencias no fueron significativas (Fig. 6.10, A y B). Estos resultados en su conjunto muestran que la utilización de los microtúneles con riego a demanda es una buena herramienta para provocar una subida de temperatura permaneciendo constante el estado hídrico de la planta, lo que permite el estudio independiente de ambos factores.



**Figura 6.10.** A) Contenido hídrico (CH) y B) Contenido hídrico relativo (CHR) de las hojas de las remolachas en las cuatro fechas ensayadas. C: control; T: Tratamiento con el microtúnel. C) % de materia seca de raíz y de hoja en el control (testigo) y el tratamiento (microtúnel) para las cuatro fechas ensayadas.

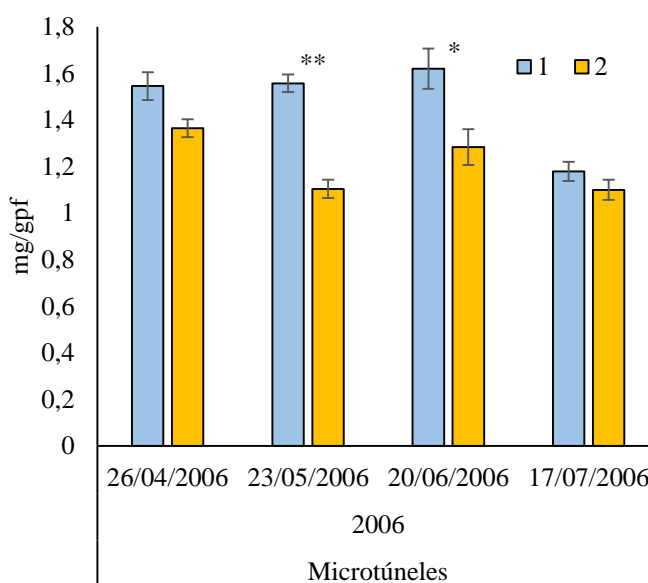
En este ensayo se determinó también la cantidad de glucosa (indicativo de los azúcares reductores presentes), la cantidad de proteína (en relación con la utilización del nitrógenos), y la cantidad de prolina, así como las actividades enzimáticas de degradación de la sacarosa. Todas estas determinaciones se hicieron tras el tratamiento de 15 días con el microtúnel al termino del cual, se quitó el microtúnel y se analizaron las remolachas de la parcela tratada y de parcelas controles sin el microtúnel. La figura 6.11 muestra la cantidad de glucosa en las cuatro fechas ensayadas. La gráfica

muestra que el tratamiento con microtúneles no modificó de forma importante la cantidad de glucosa. Se muestran diferencias más importantes entre las diferentes fechas ensayadas. Los mayores niveles de glucosa en la raíz se dan en las fechas de mayo y junio.



**Figura 6.11.** Cantidad de glucosa por 100 gpf en la raíz de las plantas ensayadas para las cuatro fechas. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis mediante t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos comentadas en el texto.

La cantidad de proteína disminuye al recibir las plantas el golpe de calor en todas las fechas muestreadas. Existen diferencias estadísticamente significativas en los meses de mayo y junio (figura 6.12.). Estos resultados indicarían que un aumento de  $T^a$  disminuye la cantidad de nitrógeno destinado a proteínas. Esto podría indicar una situación en la que se están preservando los hidratos de carbono y el nitrógeno, para ser utilizados en otras vías metabólicas, como por ejemplo, la síntesis de osmolitos.



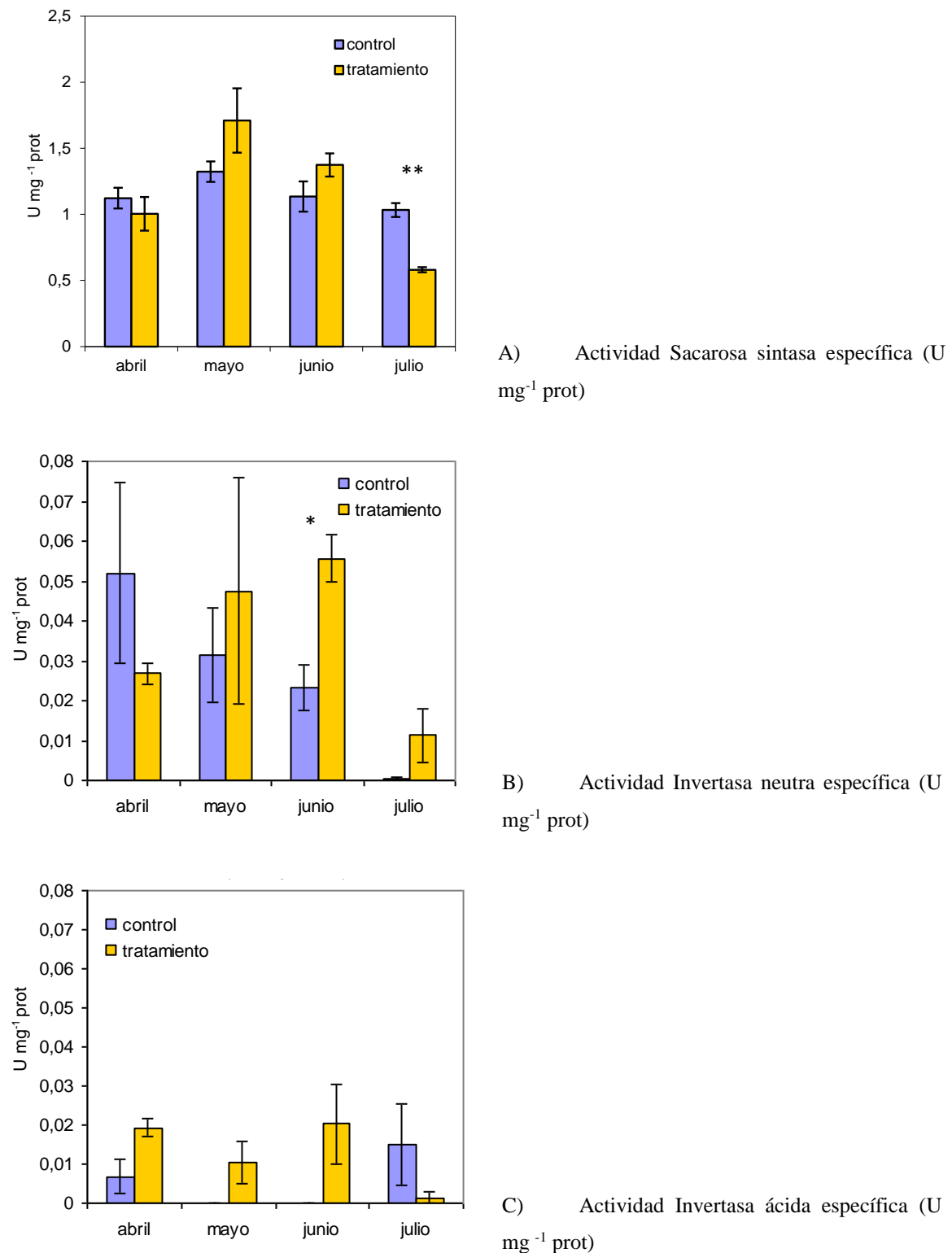
**Figura 6.12.** Cantidad de proteína por g de peso fresco presente en las raíces de las plantas en las cuatro fechas muestreadas. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis mediante t-test. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos comentadas en el texto.

**3.6.2.3. Actividades enzimáticas en el ensayo de microtúneles en la 3ª campaña**

Las actividades enzimáticas también muestran distintos comportamientos en función de las fechas del golpe de calor.

En mayo y junio el tratamiento aumenta la actividad de todas las enzimas de degradación de la sacarosa (Fig. 6.13). Esta diferencia es estadísticamente significativa en el caso de la invertasa neutra en junio. En el caso de la invertasa ácida sólo es significativo el aumento del mes de mayo. En abril se ve incrementada sólo la actividad invertasa ácida y en julio sólo la actividad invertasa neutra (Fig. 6.13). En el mes de julio la actividad SS disminuye tras el golpe de calor de forma significativa. Estos resultados refuerzan la idea del estado metabólicamente diferente que presentan las plantas en cada una de las fechas muestreadas. En las correlaciones analizadas que se presentaron en el capítulo 3.2 (Tablas 2.1, 2.3, 2.6 y 2.10), la actividad sacarosa sintasa se presenta vinculada al estado fenológico del cultivo, disminuyendo hacia el verano. Sin embargo, estos resultados del ensayo de microtúneles, ponen en evidencia que esta enzima presenta capacidad de respuesta ante el choque térmico. El golpe de calor en los meses de mayo y junio desencadenan respuestas que requieren de la movilización de reservas en la raíz.

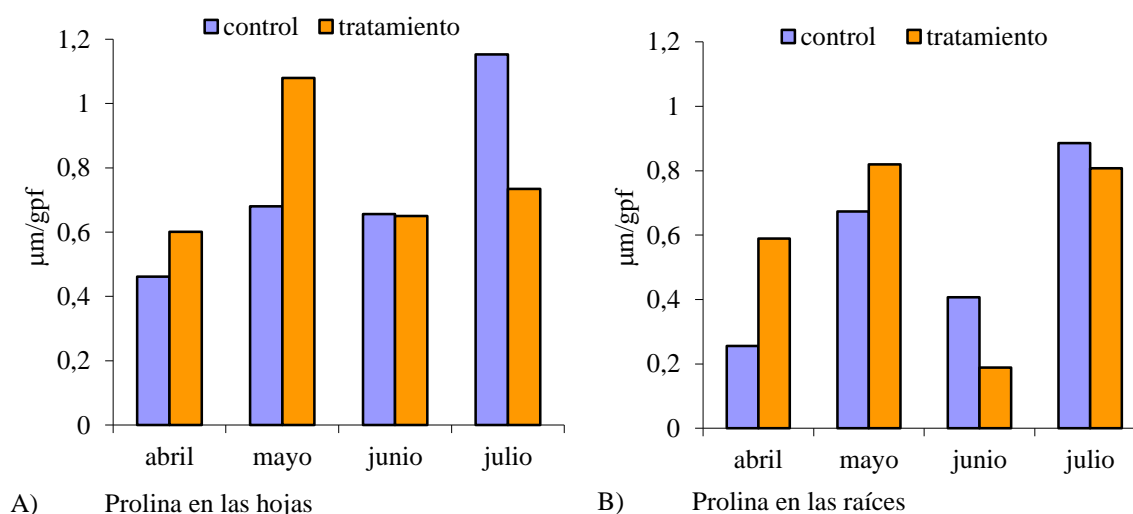
En su conjunto estos resultados muestran que las actividades enzimáticas degradativas de la sacarosa aumentan con la subida de temperatura en remolachas con estados de desarrollo de los meses de mayo y junio.



**Figura 6.13.** Actividades específicas de la degradación de la sacarosa durante los ensayos con microtúneles para las cuatro fechas muestreadas. A) Sacarosa sintasa; B) Invertasa neutra; C) Invertasa ácida. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis mediante t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos comentadas en el texto.

#### 3.6.2.4. Niveles de prolina en el ensayo de microtúneles en la 3ª campaña

Los niveles de prolina fueron medidos en hojas y raíces en las cuatro fechas ensayadas. En la figura 6.14, se muestra que en general, los niveles de prolina determinados en todos los muestreos son niveles muy bajos (entre 0,2 y 1,2  $\mu\text{moles/gpf}$ ) comparados con valores del orden de 4 -5  $\mu\text{moles/gpf}$  encontrados en otras campañas anteriores (Monreal et al. 2007). A pesar de ser muy bajos, revelan algunas diferencias entre los tratamientos. En los muestreos de abril y mayo, el tratamiento con microtúneles aumenta el contenido en prolina de raíces y hojas. En los ensayos de junio y julio la respuesta de las plantas respecto a la síntesis de prolina varía. En junio no hay diferencia en la acumulación de prolina en las hojas respecto al control. Esto esta en relación con los datos de % de materia seca, Fig. 6.10. C y % CHR, Fig. 6.10 B). Parece que el tratamiento con el microtúnel en esta fecha no produjo ningún desequilibrio hídrico a nivel de hojas. De hecho, la cantidad de prolina en raíces disminuye para esta fecha. Parece que el microtúnel mejora las condiciones hídricas de las plantas en el mes de junio. En julio vuelve a darse este efecto, aún más evidente en las hojas, pero también apreciable en las raíces. Estos datos indican que en abril y mayo, el golpe de calor produjo desequilibrios hídricos en las hojas y las raíces en los que interviene la prolina. En junio y julio, las condiciones de los microtúneles mejoran el estado hídrico de las plantas. Esta estaría en relación con una menor evapotranspiración propiciada por la presencia de la estructura de plástico.



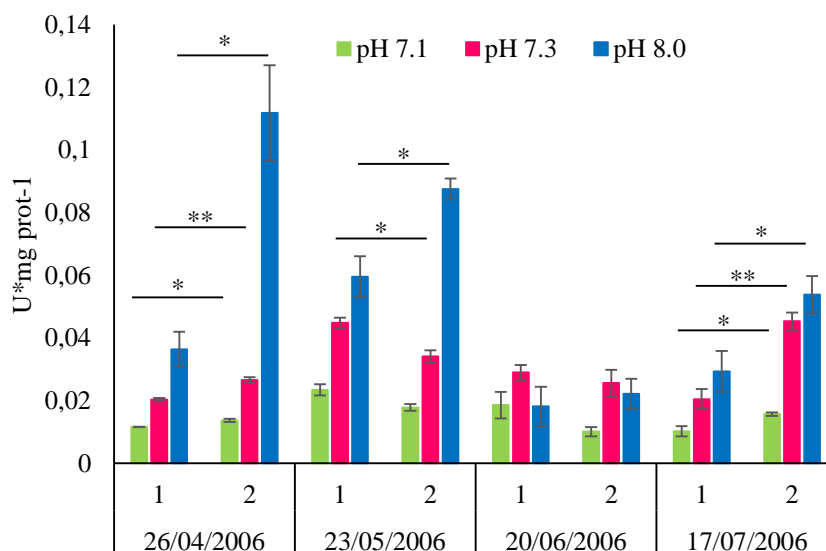
**Figura 6.14.** Acumulación de prolina en hojas y raíces en los ensayos de microtúneles en las cuatro fechas muestreadas.

### ***3.6.2.5. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en los ensayos de microtúneles en la 3ª campaña***

Durante esta campaña también se midieron los parámetros relacionados con la actividad y la regulación de la PEPC de las raíces de remolacha para establecer una posible relación de esta enzima, implicada en el metabolismo del nitrógeno en su función anaplerótica, y los tratamientos térmicos.

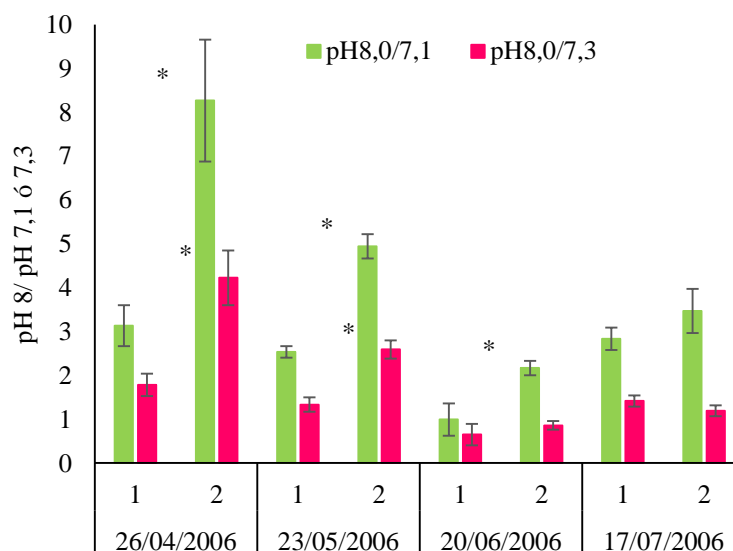
La bibliografía actual establece que la PEPC tiene una  $T^a$  óptima de 30 °C y que el pH óptimo es de 8 (Chollet et al. 1996). También es sabido que la PEPC trabaja en sus diferentes contextos fisiológicos a un pH subóptimo de 7,1 a 7,3 que son los pH celulares. La relación entre la actividad determinada a pH óptimo de 8 y a pH subóptimo de 7,3 o 7,1 se toma como una medida del estado de fosforilación de la enzima que está en relación con su estado de activación (Echevarría & Vidal, 2003). De esta manera, una relación pH 8/pH 7,3 o pH 7,1 baja, es decir, próxima a uno, indica una PEPC fuertemente fosforilada, por el contrario una relación alta refleja una enzima pobremente fosforilada (Echevarría et al. 1994). El estado de fosforilación de la enzima también puede determinarse midiendo la activación con glucosa-6P (G6P), efector positivo de la enzima. Activaciones altas en presencia de G6P indican una enzima pobremente fosforilada mientras que activaciones más bajas indican una enzima fuertemente fosforilada (Echevarría et al. 1994). Finalmente, la enzima fosforilada es resistente a la inhibición por L-malato (efector negativo de la enzima) mientras que la enzima desfosforilada es sensible al málico, siendo fuertemente inhibida por este (Echevarría & Vidal 2003). Es este apartado hemos estudiado la influencia de los golpes de calor tanto en la actividad como en el estado activación por fosforilación de la PEPC. En la figura 6.15 se presentan los datos de actividad PEPC determinada a los 3 pH de 7,1; 7,3 y 8. El tratamiento con microtúneles aumentó la actividad PEPC medida a pH 8 para todas las fechas ensayadas de forma importante y estadísticamente significativa y en el de junio de forma leve. En esta fecha llama la atención la poca diferencia existente entre la actividad de la enzima a los 3 pHs ensayados. Los valores más altos de actividad PEPC a pH 8 se dieron en los golpes de calor de abril y mayo y las actividades más bajas en junio y en julio. La actividad a pH 7,3 sigue un patrón diferente. Aumenta en el ensayo de abril y en el de julio (de forma estadísticamente significativa), pero disminuye en los ensayos de mayo (con significación estadística) y junio.





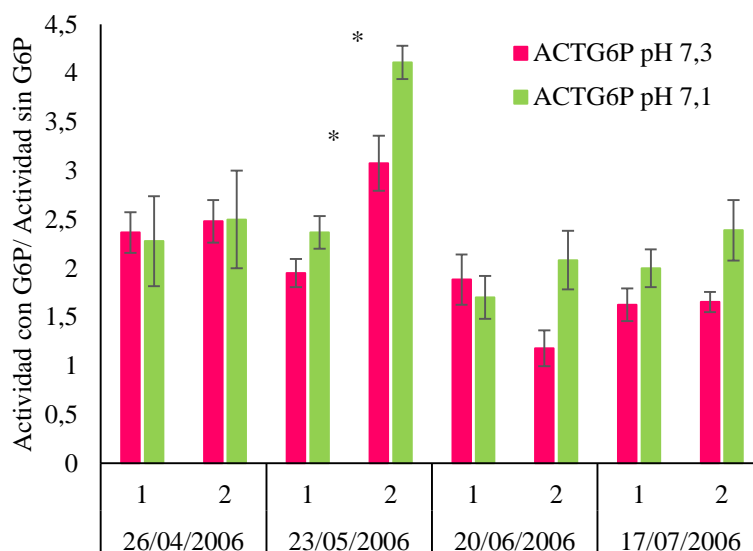
**Figura 6.15.** Actividad específica de la PEPC a los tres pHs ensayados durante el ensayo con microtúneles. ■ Actividad específica a pH 7,1; ■ Actividad específica a pH 7,3; ■ Actividad específica a pH 8. 1: Corresponde al control; 2: corresponde al tratamiento. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos explicadas en el texto.

En cuanto a los niveles de fosforilación, en la figura 6.16 se muestra la relación pH 8/pH 7,3 y pH 8/pH 7,1. El tratamiento aumenta esta relación en todos los casos, tanto de pH8/ pH 7,1 como de la de pH8/ 7,3, para todas las fechas ensayadas, excepto en la relación pH 8/7,3 para el mes de julio. El análisis estadístico revela que estas diferencias son significativas para los ensayos de abril, mayo y junio en el caso de la relación pH 8/7,1 y para los ensayos de abril y mayo para la relación pH 8/7,3. Valores de 4 y de 2,5 (abril, mayo; golpe de calor) son ratios que indican una enzima desfosforilada, mientras que los valores próximos a 1 de abril y junio indicarían una enzima fosforilada. Se puede concluir por tanto, que este parámetro apunta a que el golpe de calor en las dos primeras fechas produjo la desfosforilación de la PEPC de raíz.



**Figura 6.12.** Relación entre la actividad PEPC a los diferentes pHs medidos en las cuatro fechas ensayadas. ■ pH8/pH7,1; ■ pH8/pH7,3. 1: Corresponde al control; 2: corresponde al tratamiento. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos explicadas en el texto.

Como ya se ha señalado, la activación por G6P puede ser indicativa también del estado de fosforilación de la enzima. Los datos de activación con glucosa 6P (Fig. 6.17) concuerdan con la relación de pHs. La G6P produjo una activación de la PEPC de las remolachas tratadas en mayo que indican un bajo estado de fosforilación de la enzima. Igualmente, los proporciones de 2,5 de la PEPC de las remolachas de abril indicarían también un bajo estado de fosforilación, sin embargo, en este experimento no hay diferencias entre el control y el ensayo térmico. Finalmente, los valores de activación de la PEPC de junio y julio son mayores en el tratamiento que en el control, con un nivel de activación de la actividad por G6P que corresponderían a niveles más altos de fosforilación de la enzima.



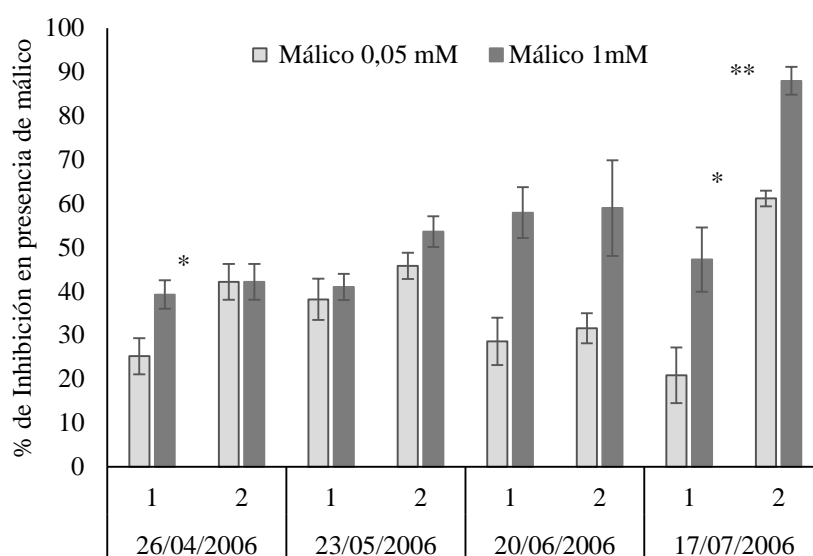
**Figura 6.17.** Activación con G6P de la actividad PEPC media a pHs subóptimos de 7,3 y 7,1. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos explicadas en el texto.

La figura 6.18 muestra el tercer parámetro utilizado para evaluar el nivel de fosforilación de la enzima, la respuesta al inhibidor L-malato. Mayores niveles de inhibición mostrarían una enzima más desfosforilada. Se ha ensayado el % de inhibición para dos concentraciones diferentes, 0,5 mM y 1 mM del efector negativo. De nuevo los datos concuerdan y el tratamiento aumenta la inhibición con málico, lo que indica que el golpe de calor desfosforila a la PEPC. Esta inhibición es más evidente en el ensayo de julio. Para la concentración de 0,5 mM hay diferencias significativas entre control y tratamiento en los ensayos de abril y mayo.

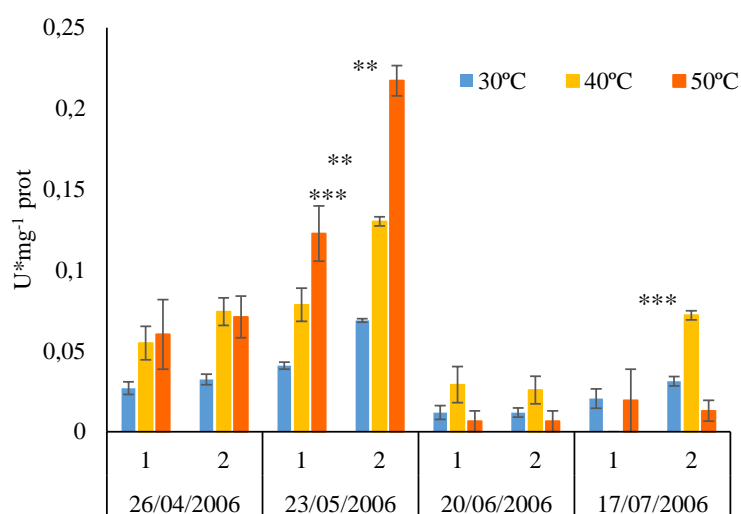
Colectivamente estos resultados indican que la PEPC se encuentra en diferentes estados a lo largo del desarrollo del cultivo. Además se pone en evidencia que el golpe de calor produce modificaciones en el estado de fosforilación de la PEPC. El ensayo del mes de mayo se manifiesta la desfosforilación de la enzima tras el golpe de calor en los tres parámetros estudiados. En el mes de abril y junio, la desfosforilación se evidencia sólo en la relación de pHs y en el ensayo de julio es en la inhibición con málico. Esto podría indicar la acción de diferentes mecanismos de regulación de la enzima.

Se realizaron también para estos muestreos los ensayos de resistencia térmica de la PEPC in vitro. La figura 6.19 muestra la actividad específica de la PEPC a pH 8 en las diferentes temperaturas ensayadas. Se observa que para los ensayos de abril y mayo, se produce un espectacular incremento del óptimo de temperatura tras el golpe de calor que representan 7,3 y 3,6 veces más actividad de la enzima ensayada a 50 °C respecto a la ensayada a 30 °C para los meses de abril y mayo respectivamente. En el ensayo de junio es donde se dan los mínimos de actividad y la temperatura óptima es 40° C, pero hay muy poca diferencia entre la actividad PEPC a las 3 temperaturas ensayadas. Finalmente, en el mes de mayo se vuelve a producir un incremento del óptimo de la PEPC

que se sitúa a 50 °C, aunque no se llega a los valores de abril y mayo. Estos resultados muestran también que el tratamiento con golpe de calor aumenta la resistencia térmica in vitro. En el muestreo de abril es el más evidente pero también se observa en los de mayo y julio. Hay que señalar que un efecto de este tipo no ha sido referido en la literatura a fecha de hoy, por lo que sería de interés profundizar en los mecanismos moleculares que pudieran estar en la base de una respuesta tan diferente a la  $T^a$  de la PEPC de los tratamientos de abril y mayo, respecto a los de junio y julio. Los datos obtenidos en los parámetros de fosforilación de este trabajo (Fig. 6.16), indican que sería la PEPC desfosforilada (mayor relación pH8/7,3 y pH8/7,1) la que presenta mayor resistencia térmica in vitro. Trabajos posteriores será necesarios para confirmar esta hipótesis.



**Figura 6.18** de inhibición de la actividad PEPC en presencia de 0,05 mM y 1 mM de málico. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos explicadas en el texto.



**Figura 6.19** . Actividad específica de la PEPC a pH 8 ensayada in vitro a diferentes temperaturas: 30 °C, 40 °C y 50 °C. Las barras de error muestran  $\pm$  EE. Análisis t-test, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Diferencias entre los tratamientos explicadas en el texto.

Estos datos en su conjunto muestran que el golpe de calor producido por los microtúneles modificó la actividad PEPC de las raíces. Este efecto es debido a la temperatura ya que como se ha visto en este capítulo, el microtúnel tuvo escasos efectos sobre la acumulación de prolina (Fig. 6.14) y en el caso de la materia seca de hojas y raíces disminuyó o permaneció similar tras el golpe de calor (Fig. 6.10). Esto muestra que los posibles efectos de un déficit hídrico estaban bastante minimizados. Las modificaciones en la actividad PEPC presentan diferentes patrones en función del momento del golpe de calor.

- En las cuatro fechas ensayadas, **el golpe de calor aumentó la actividad PEPC a pH 8**. Este aumento es estadísticamente significativo en abril, mayo y julio. En el caso de la condición control, es el muestreo de mayo y después el de abril el que muestra una mayor actividad PEPC a pH 8 y los muestreos de junio y julio una menor actividad.
- El golpe de calor aumentó la actividad a pHs subóptimos (pH 7,3 y 7,1) en abril y julio y la disminuyó en mayo.
- En cuanto a los parámetros relacionados con la fosforilación, presentan resultados contradictorios en algunos casos, indicando la posible existencia de otras modificaciones en la proteína que podrían variar su comportamiento respecto a los parámetros clásicos para medir el nivel de fosforilación.
- En el caso de la condición control, partiríamos de una **enzima más fosforilada en los ensayos de junio** según la relación entre pH 8/ pHs subóptimos y las medidas de activación con G6P. Los valores de inhibición con málico, indican que es la enzima de **julio la que muestra mayor fosforilación**.
- La enzima menos fosforilada para la condición control, la encontramos en los ensayos de abril y mayo, respectivamente, según la relación entre pHs y la activación.
- En el ensayo de mayo esto coincide con un **aumento muy notable y estadísticamente significativo en la resistencia térmica**: el golpe de calor desfosforila a la PEPC, aumenta su síntesis y aumenta su resistencia térmica in vitro, presentando una temperatura óptima de 50°C.
- En el ensayo de abril, la relación entre pHs y la inhibición con málico indican que el golpe de calor desfosforila a la PEPC (estadísticamente significativo) pero en este caso la resistencia térmica no varía.
- En el ensayo de junio es donde se dan más datos contradictorios sobre la activación por fosforilación. El golpe de calor disminuye la fosforilación según la relación de pHs (estadísticamente significativo), aumenta la fosforilación según la activación por G6P y no afecta a la fosforilación según la inhibición por málico (estos dos últimos parámetros sin significación estadística).

- En el ensayo de julio, los parámetros de activación con G6P y los de inhibición con málico (significativo) coinciden en señalar que el tratamiento disminuye la fosforilación de la PEPC de raíz.

En general, en la mayoría de condiciones y parámetros estudiados, el golpe de calor aumenta la síntesis de PEPC y disminuye su fosforilación. En las condiciones fenológicas que se dan en mayo, el golpe de calor además aumenta la resistencia térmica in vitro de la PEPC.





## **4. DISCUSIÓN**





En este trabajo se ha analizado la repercusión de los golpes de calor (aumentos bruscos de  $T^a$ , frecuentes en el verano andaluz) en la producción y la calidad de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Se ha estudiado la repercusión de los golpes de calor en parámetros agronómicos y fisiológicos tanto en condiciones de cultivo en campo como en condiciones controladas.

#### 4.1. Los efectos del túnel en los parámetros agronómicos

---

Los resultados muestran que la estrategia de utilización de un túnel de plástico fue eficaz para reproducir artificialmente los golpes de calor en el cultivo. Este tipo de túnel ha sido utilizado por otros autores en ensayos con remolacha azucarera para la inducción de déficit hídrico (Choluj et al. 2008). En el ensayo de la primera campaña, las condiciones ambientales se variaron de forma muy moderada con el uso de los túneles respecto a la parcela control, destacando una mayor temperatura diurna (entre 2 °C y 3 °C) (Fig. 1.3) en el túnel cerrado (T2) y menor humedad relativa en el túnel ventilado (T3) (Tabla 1.2.). En la segunda y tercera campaña, el túnel cerrado por un lateral (T3) permitió generar el efecto de los golpes de calor, consiguiéndose incrementos de  $T^a$  de entre 8 a 15 °C respecto al exterior (Fig. 1.9; Fig.1.11). Para comprender los resultados obtenidos fue determinante la consideración de los parámetros climáticos de cada campaña que se resumen en temperaturas moderadas y abundantes lluvias en la primera campaña, temperaturas altas y lluvias escasas en la segunda campaña y temperaturas altas y lluvias moderadas en la tercera campaña. Nuestros resultados muestran que incluso las ligeras variaciones de  $T^a$  de la primera campaña, influyen en importantes parámetros agronómicos como también ha sido descrito para otras especies en relación a pequeñas variaciones de temperatura (Lafta & Lorenzen 1995; Loveys et al. 2002). Los ensayos de la segunda y la tercera campaña nos han permitido evaluar la magnitud del efecto en las plantas de un mayor estrés y la interacción de la temperatura con otros factores limitantes para el cultivo. Además las condiciones climáticas de la segunda campaña y los resultados obtenidos permiten concluir que las remolachas de la segunda campaña estuvieron sometidas a un estrés combinado de alta temperatura (golpe de calor) e hídrico mientras que en la tercera se logró independizar parcialmente el efecto de la alta temperatura *per se* ya que las plantas estuvieron mejor hidratadas.

Durante la primera campaña, los datos muestran que la cobertura de los túneles proporcionó en el interior una mayor humedad en las situaciones de menor humedad ambiental exterior, como muestran los datos de humedad relativa mínima, mayor en los túneles cubiertos (T2 y T3) que en la situación control (T1, Tabla 1.2). Esto protegió a las plantas frente a la pérdida de agua, como muestra el mayor contenido hídrico de la plantas bajo los túneles reflejado en una mayor superficie foliar específica (Fig. 1.4.G), un menor brix del peciolo (Fig. 1.4.I) y un menor brix de la raíz (Fig.1.4.F). Estas variaciones no tuvieron repercusiones significativas en la producción de sacarosa o de raíz en recolección. Es importante destacar que las condiciones de

ligero aumento de temperatura del túnel T2 (sin ventilar, Tabla 1.2) redujeron de forma significativa la producción foliar en meses de crecimiento (mayo-junio, Fig. 1.4. C) y que esto influyó de forma apreciable en la producción de sacarosa (Fig.1.4.B) y llamativamente en la polarización de finales de mayo (Fig.1.4.E).

Estos datos señalaban a la influencia de la disminución del área foliar en meses decisivos para la producción de sacarosa en la remolacha en respuesta al aumento de temperatura. Esto también se ha puesto de manifiesto en las siguientes campañas.

Los resultados de los parámetros agronómicos analizados mostraron para la segunda campaña que el golpe de calor en T3 tuvo repercusiones dramáticas en la producción tanto de raíz como de sacarosa (Fig. 1.10A y Fig. 1.10B respectivamente). En la tercera campaña de nuevo la producción de raíz y de sacarosa caen en el tratamiento de mayor estrés térmico (T3; Fig. 1.16A). Es importante resaltar que en la segunda campaña, las producciones de raíz en recolección fueron muy bajas y se movieron entre 40 (T3) y 90 (T1) t/Ha. Para la tercera campaña, estos valores casi se duplicaron, situándose entre 100 (T3) y 150 (T1) t/Ha. Esto indica que las condiciones impuestas por los túneles durante estas dos campañas provocaron efectos en las plantas, pero sugería que otros parámetros estaban afectando a las remolachas dentro y fuera del túnel. La disminución de producción observada en las raíces de T3 en ambas campañas puede explicarse por la caída de la producción foliar. Durante la segunda campaña se produjo una fuerte caída de las hojas en T3 (Fig. 1.7 y Fig. 1.10D). Esto indica que una restricción severa del aporte de fotosintatos a la raíz, sería el componente principal de la restricción del crecimiento del sumidero, de la pérdida de biomasa de raíz ( $t\ Ha^{-1}$ ) y de producción de azúcar por hectárea ( $t\ Ha^{-1}$ ). Sin embargo, debido a esta restricción del crecimiento, la concentración de sacarosa en las raíces de T3 son comparables a las de las raíces controles (Fig. 1.10, polarización). Recientemente se sugerido que en condiciones de estrés hídrico el crecimiento de la planta se ve frenado, pero la acumulación de compuestos de carbono no se ve disminuida (Muller et al. 2011), coincidiendo con lo observado en nuestros ensayos.

En la tercera campaña la producción foliar vuelve a caer tras la apertura del túnel (Fig. 1.16C, 4º muestreo), aunque de una forma más moderada que en la campaña anterior. En esta campaña, el LAI también es menor en T3 para todos los muestreos (Fig. 1.16D). La escasa diferencia en la producción de peso fresco de hojas (Fig. 1.16C) y un LAI marcadamente diferente se deben en primer lugar a la diferencia en el contenido hídrico de las hojas (Peso seco de hojas; Fig.1.16H). Las hojas de la condición T3 presentan mayor contenido hídrico que el control desde la apertura del túnel (3º muestreo). En segundo lugar, las hojas presentan una morfología diferente (Fig.1.15), con un mayor desarrollo de peciolo y menor desarrollo de limbos. En ensayos con *A.thaliana* sometidas a estrés hídrico, térmico y combinado, han sido descritas una serie de modificaciones anatómicas de la hoja (aumento del peciolo respecto al tamaño total de la hoja, variación en el ángulo de inserción de la hoja aumentando la perpendicularidad respecto al suelo,

hiponastia) como respuesta diferencial al estrés térmico y no al hídrico (Vile et al. 2012). En este sentido, nuestros resultados coinciden con lo observado por Vile y su equipo, ratificando que durante la tercera campaña se consiguió aislar el estrés hídrico del térmico en los ensayos. Esta disminución del área fotosintéticamente activa podría explicar la reducción de la producción de raíz. En esta tercera campaña la polarización muestra diferencias importantes para el 4º y 5º muestreo (Fig. 1.16E).

Estos resultados en su conjunto muestran que en las condiciones de la segunda y la tercera campaña, el golpe de calor disminuyó la producción de raíz y de sacarosa por hectárea (raíces más pequeñas o muertas). Esta disminución de la producción global puede explicarse desde la pérdida de área fotosintéticamente activa, observada en el parámetro del LAI que disminuyó en los tratamientos respecto al control en las dos últimas campañas y que produjo una reducción del crecimiento pero no de la concentración de sacarosa.

Junto a estas evidencias, los parámetros relacionados con el contenido hídrico muestran que todas las plantas de la segunda campaña estaban sometidas a una situación de déficit hídrico que agravó el efecto térmico. La producción de raíz de las plantas control en la segunda campaña, fue la mitad que la de las plantas de la tercera campaña. En la segunda campaña, las remolachas de T3 presentan mayores valores de materia seca de hojas (Fig.1.10.H), de brix de peciolo (Fig. 1.10.J) y de brix de raíz (Fig.1.10.F). En la tercera campaña en cambio, las plantas de la condición T3 presentaban valores de contenido hídrico ligeramente mayores que los de las plantas control: menor materia seca de hojas y de raíz (Fig.1.16.H y J) y menor brix de raíz (Fig. 1.16. F) y peciolo (Fig. 1.16. I).

La subida de polarización en la siembra otoñal, es general a partir de unos determinados grados día. La acumulación de sacarosa en la raíz es progresiva a lo largo del cultivo hasta alcanzar los 3200 GDÍA (mediados de junio, normalmente). En este punto la pérdida de hojas se hace más patente y la polarización permanece constante. A partir de ese momento las variaciones en la acumulación de sacarosa pueden deberse más a la desecación de la raíz que a un aumento neto de sacarosa (Echevarría & Morillo-Velarde 2005). La llegada del verano y las altas temperaturas ayudan a aumentar la concentración de sacarosa en la raíz. Además del efecto secado, la sacarosa también puede actuar como protector osmótico y crioprotector mejorando la tolerancia al estrés abiótico (Nägele et al. 2012). Durante la primera y la segunda campaña se observó esta fuerte correlación entre la integral térmica, grados día (GDÍA) y la polarización (Tabla 1.3). Pero esta correlación se pierde en la tercera campaña. El aumento de la temperatura debido al túnel es esta 3ª campaña produjo la mayor diferencia en la integral térmica (GDÍA) entre control y T3, de las tres campañas estudiadas (Fig.1.22). El buen estado hídrico de las plantas en esta tercera campaña unido al efecto protector de los túneles (Fig. 1.21.A), generó un retraso en el aumento de la polarización en los tratamientos T2 y T3 (Fig. 1.16E). Estas dos circunstancias podrían explicar la pérdida de relación en esta tercera campaña entre la integral térmica y a

polarización y sugiere que un golpe de calor con un perfil hídrico adecuado está en la base de un desacople entre el estado fenológico y la polarización.

La comparación entre las tres campañas nos ha permitido demostrar que con una buena disponibilidad hídrica, sobre todo en los primeros momentos del desarrollo de la planta, los golpes de calor tienen mucho menos efecto en los parámetros agronómicos de la remolacha. En ausencia de lluvias sería de gran interés para la producción y la resistencia de la planta al calor, una programación de los riegos en la fase temprana del desarrollo.

El análisis de las correlaciones de los parámetros climáticos con los parámetros agronómicos se realizó tomando los datos de las tres campañas y de todos los ensayos realizados, lo que permite detectar comportamientos generales del cultivo:

- **Mayores temperaturas mínimas** (y no las temperaturas máximas) van asociadas a mayores valores en los parámetros relacionados con la materia seca de la raíz (azúcar/Ha, producción de materia seca de raíz), lo que indica un **menor contenido hídrico en la raíz** (Tabla 1.6).
- La **temperatura media** se correlaciona de forma directa con la **producción** de raíz y de hojas. La temperatura media es el parámetro que determina la integral térmica y por lo tanto va marcando el **estado fenológico** de las plantas. Durante este primer año de vida, las plantas de remolacha van creciendo, tanto la parte autótrofa como la heterótrofa, lo que explica esta correlación con las temperaturas medias
- La **evapotranspiración** calculada muestra una correlación directa con el **brix** de la raíz y con la **producción de raíz** a nivel global (Tabla 1.6). En las correlaciones de cada campaña también se observa que de todos los parámetros climáticos, es la EToC la que mantiene correlaciones importantes con la mayoría de los parámetros productivos (Tabla 1.6). Estas correlaciones son directas en producciones de raíz o de materia seca y son **inversas en el caso de la producción foliar**. En las tres campañas se observa que el túnel disminuye la EToC respecto del control (Fig. 1.21.B). Bajo las condiciones de los túneles, es la acción combinada de los parámetros climáticos (calculada como la EToC) la que regula el comportamiento productivo de la raíz.
- La **integral térmica** se correlaciona de forma directa con acumulación de **materia seca**. Esta correlación estaría relacionada con el desarrollo de tejidos maduros con menor contenido en agua y mayor contenido de estructuras fibrosas. También muestra una correlación directa con los parámetros de acumulación de **sacarosa y producción** de raíz (brix de raíz, polarización, sacarosa, % materia seca raíz, producción de materia seca de raíz, producción de raíz). Al aumentar el desarrollo de

la planta, la raíz aumenta su capacidad de sumidero tanto por tamaño como por capacidad de almacenar sacarosa. Seguir este patrón de desarrollo de la acumulación de sacarosa es fundamental para la planta para superar la vernalización y conseguir el rebrote y la reproducción en su segundo año de vida.

- La **integral térmica** muestra en cambio una correlación **inversa con la producción de hojas y la superficie foliar específica** (cantidad de agua de las hojas). Esto es una consecuencia de la siembra otoñal, que expone a las plantas en el periodo de crecimiento vegetativo más intenso a la época de mayor estrés térmico e hídrico en las condiciones climáticas del sur. Al irse desarrollando el cultivo, nos adentramos en el verano y las plantas de remolacha, con escaso control estomático, disminuyen su área foliar y activan mecanismos de respuesta a estrés, que suponen el aumento de la materia seca en hojas (acumulación de osmolitos compatibles, pérdida de agua).
- Esta respuesta de las plantas al verano queda también ilustrada en las correlaciones del **LAI** que muestra una correlación **inversa con prolina de raíz y N- $\alpha$ -amino** (que incluiría otros aminoácidos y derivados de estos como la betaína). Cuando la planta está sometida a estrés hídrico y térmico, disminuye su área foliar y aumenta la producción de sustancias protectoras.

#### **4.2. Evolución de la cantidad de glucosa, de proteínas y de las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la sacarosa.**

---

La **glucosa** y otros azúcares reductores se acumulan en condiciones específicas del desarrollo del cultivo, como en las etapas juveniles o en respuesta al estrés hídrico, y son la causa principal de la pérdida de calidad en las remolachas de siembra otoñal (Echevarría & Morillo-Velarde 2005). Durante la 1ª campaña los niveles de glucosa (Fig. 2.1) se mantuvieron en niveles muy bajos para las tres condiciones ensayadas. En la 2ª campaña (Fig. 2.4) para las tres condiciones, en el mes de abril se multiplican por 4 los valores de glucosa y se mantienen al menos en el doble que en la campaña anterior. En la 3ª campaña también se aprecian altos niveles de glucosa para las tres condiciones ensayadas pero desplazados a finales de mayo hasta finales de junio. En la segunda y la tercera campaña los niveles de glucosa son mayores en los meses centrales del ensayo, pero hacia el final del cultivo descienden. Ha sido descrito en trabajos anteriores que por encima de las condiciones de manejo del cultivo, son las condiciones climáticas las que determinan la acumulación de estos azúcares, influyendo de forma determinante el riego, la variedad y el nitrógeno incorporado por la planta (Jiménez 2004). Aumentan de forma considerable al finalizar los riegos, alcanzando para el mes de agosto un 2%, en los cultivos de secano respecto a los de regadío, y cuando las plantas acumulan gran cantidad de nitrógeno, alcanzando 1,4% (Jiménez 2004). Ninguna de las condiciones muestreadas en este ensayo arroja

valores tan altos de glucosa, manteniéndose en máximos de 0,4%. Pero son inusuales los aumentos encontrados en la segunda y la tercera campaña para los meses centrales del cultivo. Esta acumulación de glucosa en la raíz se relaciona en parte con la movilización de reservas para reponer los órganos fotosintéticos en las condiciones impuestas por los túneles y en parte con las condiciones climáticas del año agronómico.

La **cantidad de proteína** en la raíz de remolacha muestra en estudios anteriores un perfil descendente al avanzar la edad del cultivo y aumentar la acumulación de sacarosa con valores entre 2,5 mg/pf (abril) y 1,2 mg/pf (julio) (Jiménez 2004). En los ensayos de golpe de calor de las tres campañas se han registrado máximos en torno a lo encontrado en estudios anteriores, pero los valores mínimos han alcanzado los 0,5 mg/pf. En las tres campañas las condiciones de los túneles han supuesto cambios en la cantidad de proteína al menos en algún muestreo lo que indica que este parámetro tiene una rápida capacidad de respuesta. Cabe destacar el aumento de la cantidad de proteína de la raíz durante el 5º muestreo de la segunda campaña (Fig 2.5) en las tres condiciones muestreadas que coincide con la recuperación de las plantas, que a partir de ese muestreo aumentan ligeramente el LAI, la producción de hojas, la polarización y el brix. La recuperación de la capacidad de sumidero estaría asociada a una síntesis proteica a nivel de la raíz. También es destacable que en las condiciones de la tercera campaña, T3 mantiene niveles de proteína en la raíz por encima de los encontrados en los otros tratamientos. Estos datos sugieren que la adaptación al estrés térmico implica una mayor cantidad de proteínas en la raíz.

### Actividades degradación de la sacarosa

Los perfiles de evolución de las actividades enzimáticas indican que es la **SS** la enzima con **mayor actividad respecto a las otras actividades degradativas estudiadas** en la raíz de remolacha. Ha sido descrito que es esta enzima, de las encargadas de la degradación de la sacarosa, la que mayor nivel de expresión presenta en la raíz de la remolacha y que, de toda la planta, es este órgano el que mayor expresión muestra de SS (González et al. 2005). Presenta además valores más estables (menor dispersión en cada muestreo) a lo largo del cultivo, lo que indica una mayor estabilidad de la enzima (Fig. 2.3 A, 2.6 A, 2.12 A). En ensayos con distintas variedades, distintos tratamientos de riego y abonado, la expresión de la SS en raíz muestra un comportamiento similar: hay niveles altos de expresión en fases tempranas del crecimiento y va descendiendo paulatinamente hacia el final de los muestreos (González et al. 2005). Este es el patrón que se repite en nuestros ensayos. Esta enzima ha sido considerada un marcador bioquímico de la fuerza que presentan los sumideros, especialmente en órganos voluminosos donde los niveles internos del oxígeno pueden ser bajos (Xu et al. 2012). Recientemente ha sido descrito que el análisis global de los estudios hasta la fecha, indican que el desarrollo de grandes sumideros es altamente dependiente de la actividad SS. Esta relación es más evidente en plantas cultivadas lo que puede ser una consecuencia de la selección y domesticación de sus genotipos

salvajes (Ruan 2014). Los datos de nuestros ensayos confirman la importancia de esta enzima en la raíz de remolacha. También es de las tres actividades enzimáticas estudiadas en este capítulo, la que presenta una **mayor respuesta al choque térmico** ya que es la que mayores diferencias significativas presenta entre tratamientos en las tres campañas estudiadas (Tabla 2.8). También se han descrito incrementos de expresión de SS en raíces de remolacha cuando aumenta la temperatura ambiental (julio-agosto), en ensayos de abonado en exceso y siembra tardía, y en la variedad Claudia en déficit hídrico, condiciones que también aumentaban la acumulación de azúcares reductores, concluyendo que la SS está implicada en la producción de azúcares reductores a altas temperaturas (González et al. 2005).

Las correlaciones de esta enzima con el resto de parámetros estudiados a nivel global (en todas las campañas y todos los ensayos) muestran que la **actividad SS disminuye cuando avanza la edad del cultivo y existe una relación por tanto, entre la actividad de esta enzima y el estado fenológico de la planta**. Esto estaría relacionado con su correlación con **las temperaturas medias y mínimas, que disminuyen la actividad SS** (Tabla 2.10).

La actividad SS también presenta correlaciones interesantes de tipo inverso (Tabla 2.10), con los parámetros agronómicos de producción de raíz (fila 1), azúcar por hectárea (fila 3) y producción de masa seca de raíz (fila 4). Al aumentar el tamaño de la raíz acumuladora y la cantidad de azúcar, disminuye la actividad SS. Esto podría indicar un **menor papel de esta enzima en la fase de acumulación final de la raíz**. Los datos de las correlaciones encontradas a nivel global y por campaña, indican que la actividad SS tiene un importante papel en el desarrollo del cultivo, podría decirse que su mayor actividad se produce durante la etapa de crecimiento vegetativo de la planta. Esto es consistente con evidencias recientes de que SS podría jugar un importante papel en el desarrollo. Por ejemplo, el gen que codifican para SS fue uno de los 5 marcadores expresados en meristemos apicales de tallos (shoot apical meristemos, SAM) en tomate (Pien et al. 2001). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de SS promovió la iniciación y expansión de hojas en algodón, probablemente independiente del efecto osmótico (Xu et al. 2012). Estos resultados indican que la actividad SS es crítica en la función de los meristemos.

El análisis de la segunda campaña muestra un claro aumento de la actividad SS en T3, el túnel sometido a un mayor estrés hídrico y térmico, que había perdido la mayoría de hojas (Fig. 2.6 A y B). Estos resultados estarían en consonancia con los observado en estudios de expresión genética en raíz de remolacha, donde la SS aumenta su expresión en determinadas condiciones (variedades con mayor producción foliar, abonado en exceso) y en situaciones que favorecen el déficit hídrico y/o térmico (ausencia de riegos, verano) (González et al. 2005). Estos resultados indican, que además de la importancia de SS en la fase de crecimiento, la SS podría responder a situaciones que requieran la movilización de reservas, como fue el rebrote de hojas después de la gran defoliación sufrida por las plantas en la segunda campaña. Se ha constatado que los genes



de SS son activados en situaciones de privación de carbohidratos, están fuertemente inducidos en bajas condiciones de oxígeno y muestra patrones de expresión estrechamente relacionados con la importación de la sacarosa proporcionando prioridad de supervivencia a tejidos clave (Koch 1996; Koch et al. 2000; Zeng et al. 1998).

En general la expansión celular es conducida por la acumulación de sacarosa y solutos compatibles en la vacuola para mantener un bajo potencial hídrico, esto se vuelve de esencial importancia bajo condiciones de sequía, donde las células no consiguen expandirse hasta el tamaño normal (Hoffmann 2010). En la segunda campaña nuestros resultados parecen indicar que las alteraciones de las actividades hidrolíticas que se observan en T3 priorizan la acumulación de sacarosa (Fig. 1.10 E; polarización) en detrimento tanto de la producción de biomasa foliar (Fig. 1.10 C) como de raíz (Fig. 1.10 A). En el primer año de crecimiento, la prioridad de la remolacha es acumular sacarosa en la raíz para poder hacer frente a la reproducción. La estrategia de las remolachas de T3 parece confirmar dicho comportamiento.

Todo esto indica que en la raíz de la remolacha azucarera en las condiciones estudiadas, la actividad sacarosa sintasa tiene un importante papel en el crecimiento del sumidero, disminuye su actividad en el periodo de concentración de sacarosa y permite la movilización de reservas para reponer los órganos fotosintéticos ante la privación de carbohidratos.

La invertasa neutra (**IN**) tiene en general perfiles muy similares a lo largo de las tres campañas (Fig. 2.3. C y D; Fig. 2.6. C y D, Fig. 2.12. C y D). Desciende a lo largo del periodo muestreado y repunta tras los riegos. Para esta enzima, es en la segunda campaña donde aparece un mayor impacto inducido por el golpe de calor (más diferencias entre tratamientos). Su actividad parece estar relacionada con el **estrés hídrico** ya que tiene repuntes en el último muestreo (tras el cese de los riegos) y mayores diferencias entre el control y el tratamiento en la segunda campaña (importante déficit hídrico). Esto estaría reforzado por las correlaciones globales encontradas con esta actividad. La actividad IN total se correlaciona de forma directa y muy significativa en todas las campañas, con la cantidad de **N- $\alpha$ -amino en raíz, con la cantidad de potasio y de sodio** (Tabla 2.11). Estos tres parámetros son indicadores, entre otras cosas, de que se está llevando a cabo un proceso de ajuste osmótico en la raíz. También se encuentra una correlación significativa y positiva a nivel global con la actividad total de sacarosa sintasa. Ambas enzimas actuarían en situaciones que requieran movilización de reservas para reponer las hojas o generar respuestas de ajuste osmótico, principalmente en la etapa de crecimiento de la planta. Ha sido descrito que esta enzima presenta sus máximos de actividad en febrero, cuando la planta está en pleno crecimiento. A partir de ahí comienza a descender (Jiménez 2004). Recientemente, varios ensayos han otorgado un importante papel a esta enzima en el crecimiento de la raíz. Mutantes de *Arabidopsis* con dos de los 9 genes de CIN silenciados, muestran un reducido crecimiento de la raíz (Barratt

et al. 2009). También se han visto estas reducciones en el crecimiento de la raíz y reducciones en la floración en *Lotus japonicus* (Welham et al. 2009) y arroz (Jia et al. 2008). Esto concuerda con nuestros resultados y la correlación entre ambas enzimas.

La actividad invertasa acida (**IA**) no presenta diferencia entre los tratamientos en ninguna de las campañas, por su gran dispersión de los valores de cada muestreo, lo que parece indicar que tiene un patrón de respuesta rápido a **demandas puntuales de movilización de reservas**.

#### 4.3. Estrés térmico vs estrés hídrico: Prolina y parámetros hídricos

---

En este trabajo hemos determinado la cantidad de prolina como índice de estrés hídrico (Monreal et al, 2007). Además, se ha relacionado la prolina acumulada en los distintos órganos de la planta con determinados parámetros agronómicos representativos del estado hídrico de la raíz y las hojas. El seguimiento de este osmolito en las diversas condiciones de ensayo, nos han permitido establecer cómo es la dinámica de acumulación de este metabolito en situaciones de presión ambiental y los patrones de respuesta a estrés asociados al ajuste osmótico en *Beta vulgaris*.

El análisis de las correlaciones de la prolina de la raíz (altísimo nivel de significación  $<10^{-5}$ ) con el resto de parámetros, en todas las situaciones ensayadas, aporta un buen esquema general del funcionamiento de la prolina como osmolito en esta planta (Tabla 4.5).

Su correlación directa con el **nitrógeno  $\alpha$ -mino, con los azúcares reductores (fructosa y glucosa) y con el  $\text{Na}^+$**  pone de relevancia que no sólo la prolina se acumula como osmolito en las raíces en situaciones de estrés, también otros aminoácidos y amidas e iones, razón por la que ambos parámetros están correlacionados. Los azúcares reductores también pueden funcionar como osmolitos compatibles y se acumulan en remolacha azucarera en respuesta a sequía (Antolín & Sánchez-Díaz 1993) junto con otros osmolitos como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , aminoácidos y glicina betaína (Hoffmann 2010). Además, las situaciones de estrés demandan un gasto energético que en el caso de la raíz genera la movilización de las reservas de sacarosa.

Las correlaciones de la prolina son directa con **el porcentaje de materia seca** de los diferentes órganos de la planta (peciolo, hojas y raíz) e inversas con la **superficie foliar específica, el número de hojas por planta y el LAI**. Esto señala nuevamente, como este aminoácido es una respuesta al déficit hídrico y cómo está implicado junto con otros parámetros en la respuesta de aclimatación de la planta a este tipo de estrés. Los parámetros agronómicos de % de materia seca, junto con el Brix y la superficie foliar específica por materia seca (SFEMS), son usados como índices del estado hídrico y de acumulación de sustancias en disolución (Morillo-Velarde & Ober 2006). Además ha sido descrito que la SFEMS se ven disminuidos en las plantas sometidas a estrés hídrico (Poorter et al. 2009). La disminución de la cobertura es un mecanismo bien conocido de las plantas para tolerar situaciones de sequía. En el caso de la remolacha azucarera,

cuando las plantas están bajo estrés hídrico severo, las hojas no se recuperan a partir del mediodía, marchitándose por la tarde (Hanks et al. 1981). En el estrés por la sequía tanto la formación de hojas como la producción de raíz se ven reducidos (Hoffmann et al. 2005).

En este trabajo se pone de manifiesto que en condiciones de déficit hídrico las plantas de remolacha disminuyen su área foliar y acumulan osmolitos compatibles, como la prolina en la raíz.

El seguimiento en los diferentes ensayos del contenido en prolina de hojas y peciolo, además de en raíces, nos ha llevado a establecer una interesante relación entre el origen de la señal de estrés y la acumulación de este osmolito en diferentes órganos de la planta y en diferentes situaciones.

Durante la segunda campaña, además de en el ensayo de golpe de calor, se evaluó el contenido de prolina en un ensayo de riego restringido con parcelas de secano, con aporte hídrico del 60% y parcelas controles regadas. Este ensayo nos aporta la evidencia de que es la restricción hídrica severa del secano la que desencadena la mayor acumulación de prolina, y que ésta ocurre en la raíz (Fig. 4.2; raíz). Los niveles de prolina del control y de riego restringido (60% de agua) permanecen mucho más bajos con un ligero incremento de la cantidad de prolina tras la finalización de los riegos. En el ensayo de golpe de calor la distribución de la prolina es diferente; además, en T3 se acumula prolina en las hojas en el muestreo del 16 de mayo, coincidiendo con la máxima defoliación de la planta (Fig. 4.3). Los resultados de la Tabla 4.2 muestran que, en ambos ensayos, fue la prolina acumulada en la raíz la que mejores correlaciones presentaba con los parámetros hídricos estudiados. Sin embargo se hallaron diferencias importantes entre ambos tipos de ensayo. En el ensayo de riego restringido las correlaciones más significativas (\*\*) se establecen entre la prolina de la raíz y la materia seca de la raíz y con el brix de la misma. Por el contrario, en el ensayo del golpe de calor la prolina de la raíz se correlaciona con una alta significación (\*\*) con el SFEMS y con % de MS de la hoja. Estos resultados indican que el contenido en prolina de la raíz acumuladora está relacionado con el estrés hídrico, siendo cuantitativamente mucho más importante en este órgano que en hojas y peciolo. También nos llevó a concluir que la respuesta de *Beta vulgaris* al déficit hídrico es diferente según qué órgano de la planta reciba la señal (hoja, en el golpe de calor, o raíz, en el ensayo de secano). Estos resultados son de gran interés ya que no hay estudios que muestren esta diferente respuesta a la acumulación de prolina en remolacha azucarera en relación con la señal de estrés.

Esto se puso de manifiesto también en ensayos llevados a cabo en cámaras de cultivo, donde se repitieron los resultados observados en campo. Es el estrés hídrico severo el que dispara la acumulación de prolina en las hojas (Fig. 4.9, Ensayo hídrico, día 10) en plantas no aclimatadas y produce una acumulación de prolina en raíces mucho mayor que la debida al estrés térmico (Fig. 4.11, Raíces). También fue ratificada la fuerte relación entre la acumulación de prolina en raíces y el brix de raíz (Fig. 4.13), poniendo de manifiesto que ambos parámetros son buenos índices de

estrés hídrico en la raíz y un reflejo de la capacidad de ajuste osmótico de este órgano para enfrentarse a déficits de agua. Respecto a la respuesta de acumulación de prolina en diferentes órganos de la planta, cabe destacar los estudios con plantas de remolacha quiméricas en las que se ha introducido los genes *ZxNHX* y *ZxVP1-1* que codifican para un antiporte de Na/K del tonoplasto de la planta xerofítica *Zygophyllum xanthoxylum*. Esta expresión confiere tolerancia a la salinidad a las plantas transformadas, creciendo de forma adecuada a concentraciones de NaCl que producen clorosis en las plantas salvajes. Estas plantas modificadas acumulan más prolina, sodio y potasio en las hojas y peciolo cuando están expuestas a alta salinidad, disminuyendo el potencial de soluto en las hojas, reteniendo más agua y disminuyendo los daños en la membrana celular. Las plantas quiméricas acumulan mucha más sacarosa, glucosa y fructosa en las raíces acumuladoras que las plantas salvajes en ausencia o presencia de sal (Wu et al. 2015). Estos trabajos van en el mismo sentido de lo observado en nuestras plantas de remolacha respecto a la acumulación diferencial de prolina en los distintos órganos según las características del estrés y la aclimatación. Las altas y puntuales acumulaciones de prolina en las pocas y pequeñas hojas de las plantas sometidas a déficit hídrico, responden a la necesidad de la planta de, en ausencia de transpiración puntual, establecer el flujo de agua ajustando el contenido de osmolitos en la hoja (León et al. 2006).

Nuestros trabajos también han puesto de manifiesto que el aumento de las temperaturas (golpe de calor) induce, con frecuencia, una situación de déficit hídrico, provocando un desequilibrio entre la velocidad de transpiración y la de incorporación de agua por la planta. Esto ocurre en cultivos de regadíos e incluso en cultivos hidropónicos con total disponibilidad de agua, como se ha comprobado en los experimentos de estrés térmico en condiciones controladas (Fig. 4.10, estrés térmico). Esto también se puso de manifiesto durante la tercera campaña, donde las raíces de los tratamientos más estresado del ensayo hídrico (Fig. 4.5, Secano) y térmico (Fig. 4.6, T3), fueron las que más prolina acumularon. Pero lo más llamativo fue que estas plantas de la 3ª campaña, en general, tanto en el ensayo térmico como el hídrico, mostraron una escasa acumulación de prolina en raíces (del orden de 2,4 veces menos en el ensayo térmico, 6 veces menos en el ensayo hídrico, respecto a los valores de la segunda campaña) y no registraron acumulación destacable de prolina en hojas. Estos datos muestran claramente que las plantas de la segunda campaña mostraban un claro déficit hídrico, que se vio agravado por el estrés térmico suministrado por los túneles, desencadenando la síntesis de prolina.

Durante la tercera campaña fue medido el contenido hídrico (CH) y el contenido hídrico relativo (CHR) de las plantas para intentar establecer los umbrales del estado hídrico de la planta que generaban las grandes subidas de prolina en hojas observadas en la segunda campaña. En la bibliografía aparecen numerosas referencias a los intervalos de CHR que pueden alcanzar las plantas de remolacha bajo diversas condiciones de estrés. Estudios de modelización realizados sobre 317 especies en 72 estudios de diversos biomas (incluido el mediterráneo), han definido un

valor umbral de RWC (CHR) en el punto de pérdida de turgor del 75% para evitar la inhibición metabólica (Bartlett et al. 2012). En estudios en *Beta vulgaris* sometida estrés hídrico en condiciones de campo y previa aclimatación, se han constatado CHRs para las hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico de 60%-65% y para las plantas control CHRs de entre 72%-85%. (Hajheidari et al. 2005). Para hojas de remolachas sometidas a estrés salino se han señalado valores de CHR entre 55% y 76% según la variedad, para 200 mM de NaCl durante 30 días. Las plantas control (0 mM NaCl) mostraban un CHR en torno al 78% para todas las variedades (Ghoulam et al. 2002). También han sido medidos CHR de entre el 44% y el 59% para diferentes genotipos (intolerantes o tolerantes a la sequía) de remolacha azucarera sometidas a condiciones de sequía durante 7 días. En condiciones de riego adecuado, los CHR presentaban valores de entre 55% a 74% (intolerantes/ tolerantes a la sequía) (Shaw et al. 2002). Las plantas mueren por debajo de CHR de entre el 20 y el 50% dependiendo de la especie por lo que según estos datos, excepto en muestreos puntuales del control, las plantas de la tercera campaña estarían entre un 70-80% de su plena turgencia (Fig. 4.7, Fig. 4.8), lo que para las condiciones ambientales del verano andaluz y por lo recogido en la bibliografía, es un buen estado de hidratación como ya nos habían confirmado los niveles de prolina.

Es complejo establecer umbrales absolutos de nivel hídrico a partir del cual se dispara la acumulación de prolina en hojas ya que los patrones de distribución de prolina en hojas y raíces, así como los contenidos netos alcanzado en cada órgano parecen estar estrechamente relacionados con el historial de riego de la planta y con los procesos de aclimatación. Pero estos datos ponen de relevancia la importancia del control de los riegos a través de valores de la propia planta y no sólo climáticos.

#### **4.4. Influencia del estado de desarrollo en la respuesta al golpe de calor: microtúneles**

---

El estado de desarrollo y la posibilidad de aclimatación son variables que influyen de forma determinante en el efecto del estrés sobre las plantas. Con la colocación de los microtúneles en junio y julio, durante la segunda campaña y en mayo, junio, y julio durante la tercera se pudo completar el estudio de la repercusión de los golpes de calor en la remolacha en condiciones de campo. Se evaluó el efecto del golpe de calor en relación con el estado de desarrollo del cultivo, de forma inmediata y en recolección, esto es, una vez quitado el túnel la mitad de la parcela se destina a análisis inmediato de los diferentes parámetros y la otra mitad se deja hasta recolección.

En cuanto a la influencia de los túneles a corto plazo (efecto inmediato), se observó que fue escasa sobre los parámetros fisiológicos. Cabe destacar que SS e IN presentan diferencias estadísticamente significativas en alguno de los muestreos en las dos campañas (Fig. 6.3 A, C; Fig. 6.13 A, B). Pero según la campaña, las actividades aumentan o disminuyen con el tratamiento.

Este fenómeno es esperable dado los factores tan diferentes que afectaron a las plantas en cada año agronómico.

Es de señalar que el efecto inmediato del golpe de calor es más significativo cuando se produce en etapas tempranas del desarrollo (Tabla 6.2, tercera campaña). Los efectos sobre el cultivo del estrés térmico pueden llegar hasta recolección, cuando se combinan con déficit hídrico. En ese caso, también afectan a más parámetros agronómicos cuando se producen en la etapa de crecimiento más activo del cultivo (Tabla 6.1, segunda campaña). El golpe de calor de abril produce un impacto mucho mayor en el cultivo en cuanto a producción, que cae fundamentalmente por la falta de crecimiento de las plantas del microtúnel y por un leve descenso en la polarización.

El análisis de los datos reagrupados (Tabla 6.3, 6.4) muestra que la aplicación de un golpe de calor tiene efectos en recolección con una disminución de la biomasa total (PRO) y de la polarización (POL) entre otros parámetros. Parece que se produce una inhibición del crecimiento, posiblemente por las limitaciones en la fotosíntesis que impone el aumento de temperatura. Los golpes de calor, en condiciones de riego adecuado, no afectaron a la calidad del jugo (no hay variación significativa en el contenido en azúcares reductores, ni en el % VTIR ni el potasio). Algunos parámetros cuya acumulación determina una peor calidad del jugo (N- $\alpha$ -amino, Sodio), incluso disminuyeron, debido posiblemente a la protección frente a la demanda evapotranspirativa del ambiente, que supuso el efecto del microtúnel.

Estos datos revelan que cuando la planta ha concluido su crecimiento vegetativo y en parcelas bien regadas, con buena disponibilidad hídrica, se ha producido un periodo de aclimatación a altas temperaturas, los golpes de calor no desencadenan respuestas en la planta que puedan influir en la calidad de la sacarosa producida aunque si en la producción total. La planta es capaz de aclimatarse y superar esta situación.

#### **4.5. La actividad PEPC y el estado metabólico de la raíz**

---

Se ha abordado el estudio de la actividad PEPC de *Beta vulgaris*, principalmente en la raíz acumuladora, los mecanismos de regulación de la actividad de esta enzima y la influencia del momento del desarrollo y el estrés ambiental en la actividad y la regulación de la enzima. La PEPC es una enzima fuertemente regulada por fosforilación reversible y esta fosforilación desensibiliza a la enzima frente al L-malato, efector negativo de su actividad (Chollet et al. 1996). La IC<sub>50</sub> de la enzima al L-malato se utiliza con frecuencia para determinar su estado de fosforilación siendo una mayor IC<sub>50</sub> representativa de una enzima fosforilada (Echevarría & Vidal 2003). La dificultad de calcular la IC<sub>50</sub> en algunos tejidos y órganos C<sub>3</sub> ha llevado a diseñar otros ensayos para evaluar el grado de fosforilación de la enzima. En concreto, la relación de la

actividad de la enzima entre el pH óptimo de 8 y la actividad a los pHs subóptimo de 7,3 y 7,1 han puesto en evidencia que dicha relación disminuye cuando la enzima se encuentra más fosforilada (Echevarría et al. 1994). Así mismo se ha visto un aumento de la afinidad de la enzima por su efector positivo, la glucosa-6P, cuando la enzima está fosforilada (Echevarría & Vidal 2003). Se ha descrito que la activación diferencial de la forma fosforilada y no fosforilada por glucosa-6P se detecta a pHs subóptimos de 7,1 y 7,3 y no a pH óptimo de 8 siendo la activación por glucosa-6P mayor cuando la PEPC se encuentra desfosforilada (PEPC-OH) (Echevarría et al. 1994).

### **La actividad en condiciones óptimas**

Los valores de **actividad específica** y **actividad total** a pH 8 de la PEPC obtenidos en las tres campañas estudiadas son bajos comparados con los valores obtenidos en otras campañas (Jiménez 2004). Estudios anteriores han mostrado que la actividad de la PEPC a pH 8 establece una buena relación de la actividad con la cantidad de PEPC. Mayor actividad a este pH evidencia mayor cantidad de proteína (Chollet et al. 1996). Los mínimos en la primera campaña para la actividad específica (Fig. 5.1) son hasta 4 veces menores que los detectados en campañas anteriores (Jiménez 2004) lo que evidencia una menor cantidad de PEPC para esta variedad. La segunda campaña es la que muestra los menores valores de actividad PEPC y la tercera campaña se mantiene en el rango de valores de la 1ª campaña.

El efecto de los tratamientos en estos parámetros también es variable según la campaña. En la primera campaña (Fig. 5.1 y 5.2) las actividades a pH 8 muestran escasas diferencias entre tratamientos (2 muestreos en la actividad específica, ninguno en la total). Durante la segunda campaña (Fig. 5.15 y 5.16) existen más diferencias significativas entre los tratamientos (3 muestreos en la actividad específica, 5 muestreos en la total). Es en la tercera campaña donde más amplias son las diferencias entre los tratamientos (todos los muestreos excepto el 3º para la actividad total y la específica). Estos datos nos indican en primer lugar, que la actividad PEPC responde en la raíz de remolacha a variaciones ambientales, ya sean ligeras, como las de la primera campaña o de mayor amplitud como las de la segunda campaña. Las condiciones de mayor déficit hídrico de la segunda campaña, en general disminuyen la actividad PEPC a pH 8. Por último, el estrés térmico ambiental de la tercera campaña tiene importantes repercusiones en la actividad PEPC en las raíces de la planta, aumentando la cantidad de PEPC.

La importancia de esta actividad enzimática en el órgano acumulador, queda de manifiesto al analizar las correlaciones encontradas con otros parámetros agronómicos, climáticos y metabólicos. En cada campaña se analizaron estas correlaciones en el contexto de los golpes de calor con túneles. También se realizaron correlaciones globales teniendo en cuenta todos los

ensayos realizados (hídrico, térmico y microtúneles) (Tablas 5.13, 5.14, 5.15). En las tres campañas y a nivel global, la **actividad PEPC a pH 8 disminuye**:

- Cuando aumenta el **estrés ambiental**: aumenta la temperatura, máxima, media o mínima, aumenta la evapotranspiración, disminuye la humedad relativa, aumenta el % de materia seca de la raíz (Tablas 5.1, 5.4, 5.8, 5.15). Las condiciones de mayor demanda hídrica, disminuyen la actividad óptima de la PEPC determinada a pH 8.
- Al progresar el **desarrollo fenológico** del cultivo, ya que tiene una importante correlación inversa con la integral térmica (Tablas 5.1, 5.4, 5.8, 5.13).
- Cuando disminuye la **actividad sacarosa sintasa y la cantidad de ATP** (Tablas 5.1, 5.4, 5.8). El papel de la cantidad de PEPC en la raíz, altamente correlacionado con la actividad sacarosa sintasa, está relacionado con el crecimiento activo de la raíz. Ambas enzimas presentan mayores valores de actividad en los momentos del cultivo en los que se da una importante actividad de crecimiento y división celular. Hacia el final del cultivo, donde la raíz está sometida a un proceso de expansión pero el crecimiento y la reposición de órganos fotosintéticos están muy reducidos y prima la acumulación de sacarosa, decae la importancia de estas actividades enzimáticas.

En el resto de parámetros hay diferencias importantes entre las campañas, que están relacionadas con las diferentes situaciones ambientales sufridas por las plantas.

En la primera y segunda campaña además de con los parámetros ambientales, la actividad PEPC muestra importantes correlaciones con los parámetros que miden la respuesta de la planta a las condiciones de déficit hídrico y al desarrollo del cultivo. Así, en la primera y la segunda campaña, **la actividad PEPC disminuye**:

- Cuando aumenta la producción total de la planta, la producción de raíz y la producción de azúcar por hectárea relacionado con el proceso de crecimiento de la raíz acumuladora (Tabla 5.1, 5.4).
- Cuando aumenta la polarización y el brix (Tabla 5.1, 5.4) estos parámetros están estrechamente relacionados con la producción de sacarosa y el crecimiento de la raíz (Echevarría & Morillo-Velarde 2005) pero también con situaciones de déficit hídrico en las que se produce la acumulación de osmolitos compatibles como han confirmado nuestros resultados (León et al. 2006).
- Cuando disminuye el nitrógeno que circula por la planta, la cantidad de proteínas y la cantidad de  $K^+$ . Esto estaría relacionado con lo comentado anteriormente sobre el momento de crecimiento de la raíz, con el estado de desarrollo de las hojas y con el ajuste osmótico en el que podría estar interviniendo la PEPC.



Estos tres puntos evidencian el papel central de la PEPC en el metabolismo del C y el N en la raíz de remolacha azucarera. La función de la PEPC en el reparto de fotosintatos está ampliamente descrita (O'Leary et al. 2011). Nuestros resultados muestran además indicios del papel de esta enzima en el crecimiento del órgano de reserva. Su relación con el nitrógeno y las proteínas podría estar relacionada con la función anaplerótica, suministrando esqueletos carbonados para la respiración y para la síntesis de proteínas, en los momentos de crecimiento (Chollet et al. 1996). Su relación con el  $K^+$  podría indicar su participación en la incorporación de iones con función osmótica (incorporación de  $Na^+$  y  $K^+$ ), suministrando aniones ( $malato^{2-}$ ) a la raíz para la incorporación de estos cationes (Chollet et al. 1996).

### **Regulación de la PEPC por fosforilación en *Beta vulgaris***

No existen trabajos sobre la activación de la PEPC por fosforilación en la raíz de *Beta vulgaris*. En primer lugar era necesario evaluar si los parámetros utilizados en otras especies y en plantas  $C_4$  para determinar el grado de fosforilación de la enzima, podrían aplicarse en la PEPC de raíz de remolacha azucarera.

#### **1. La activación en presencia de glucosa-6P a concentración saturante a pHs subóptimos**

Las dificultades para evaluar la  $IC_{50}$  (sensibilidad al málico de la enzima, normalmente utilizada como indicador de fosforilación de esta) nos llevó a utilizar el parámetros de la activación por glucosa-6P para evaluar el grado de fosforilación de la PEPC. Es importante destacar que nuestros datos confirman que la PEPC de raíz de remolacha responde de forma diferencial a la activación con glucosa-6P en función del pH al que se mida la actividad. Este efecto ha sido descrito en PEPCs  $C_4$  fotosintéticas (Echevarría et al. 1994). En la PEPC de raíces de remolacha, a lo largo de las tres campañas estudiadas, se observa este efecto diferencial entre el pH y el efecto de la glucosa-6P en la actividad de la enzima. A pH 8 no se observa activación en ninguna de las campañas, la relación de la actividad con/sin glucosa-6P es cercana a 1 a lo largo de todo el periodo estudiado (Fig. 5.9, 5.19, 5.27) independientemente de las condiciones de ensayo (T1, T2, T3). A pHs subóptimos pero fisiológicos de 7,1 y 7,3 es donde se observa una mayor activación diferencial en presencia de glucosa-6P (Fig. 5.9, 5.19, 5.27). En esta respuesta sí se encuentran variaciones:

- En la primera campaña, este efecto activador es similar en las tres condiciones ensayadas (T1, T2, T3) y más evidente a pH 7,1. Pero varía a lo largo del desarrollo del cultivo, presentando los máximos durante los muestreos del mes de mayo, para los tres tratamientos y disminuyendo después dramáticamente (Fig.5.9 A, B, C). T2, el tratamiento más estresado, presenta menor activación.

- En la segunda campaña (Fig. 5.19), cabe destacar que la activación a pH 7,3 y 7,1 es similar y que se mantiene para los tres tratamientos en el rango de los mínimos registrados en la primera campaña.
- En la tercera campaña (Fig 5.27) vuelven a darse mayores diferencias de activación a pH 7,1 y un marcado perfil diferente de T3 respecto a las otras dos condiciones. T3 presenta mayor activación en los muestreos centrales.

El hecho de que la activación a pHs subóptimos muestre diferencias entre tratamientos, entre periodos fenológicos y entre campañas, implica la existencia de otros factores relacionados con la regulación de la PEPC que estarían influyendo en el nivel de esta activación. Uno de los factores relacionados con esta activación descritos, es el nivel de fosforilación de la enzima (Echevarría et al. 1994). Según este parámetro la enzima estaría preferentemente desfosforilada cuanto mayor sea su activación. Esto para la primera campaña se da en los primeros muestreos, indicando que la forma preferentemente desfosforilada de esta enzima se da en la etapa joven del cultivo y aumenta su grado de fosforilación conforme avanza el cultivo.

## **2. La relación entre pH8/pHs supóptimos de 7,3 y 7,1**

Este parámetro también ha sido determinado para evaluar el grado de activación de la enzima en este ensayo. La relación de la actividad de la enzima entre el pH óptimo de 8 y la actividad a los pHs subóptimo de 7,3 y 7,1 disminuye cuando la enzima se encuentra más fosforilada (Echevarría & Vidal 2003). Cabe destacar, que la relación de pHs, al igual que la activación por glucosa-6P, sigue patrones diferentes en función de las campañas, las condiciones ambientales y el momento fenológico.

La relación pH8/7,1 muestra diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Pero en la primera campaña (Fig.5.7) y en la segunda campaña (Fig. 5.17), la diferencia es en dos muestreos. En cambio, en la tercera campaña (Fig. 5.23) hay diferencias significativas entre los tratamientos en 6 de los 8 muestreos. Las condiciones de la tercera campaña sobre T3 afectaron de forma determinante este parámetro.

Las diferencias encontradas en la relación pH8/pH7,1 estaría mostrando diferentes procesos de regulación de la PEPC en función del momento del desarrollo y el estrés ambiental, respondiendo de forma remarcable al estrés térmico de la planta. Los valores encontrados para esta relación, concuerdan con los de activación en presencia de glucosa 6-P, en las mismas situaciones. Estos dos parámetros, indicadores de la fosforilación de la PEPC, están correlacionados entre ellos en las tres campañas estudiadas de forma directa y contundente (Tabla 5.2, 5.5, 5.9), indicando que responden a cambios en el estado de activación de la enzima por fosforilación. Además, estas correlaciones van en el sentido descrito para las PEPCs fotosintéticas: mayores valores de la relación pH8/pHs subóptimos implican mayores valores de

activación en presencia del efector positivo. La PEPC fosforilada es menos sensible a málico, responde a menores concentraciones de glucosa-6P y es más eficaz a pH subóptimo pero fisiológico de 7 y 7,3 (Echevarría & Vidal 2003). La enzima fosforilada tiene el potencial de amplificar el efecto de la glucosa-6P, protegiendo a la enzima de la inhibición por L-malato. En ausencia de malato y presencia de concentraciones saturantes de glucosa 6P (4 mM), el grado de activación de la enzima fosforilada es menor que para la enzima no fosforilada (valores de 2,3-OP; 10-OH a pH 7,1 y valores de 1,1-OP; 2,8-OH a pH 7,3) (Echevarría et al. 1994).

El tercer parámetro estudiado ha sido el grado de inhibición ante el efector negativo de la enzima el L-malato. En este caso no se determinó la  $IC_{50}$  sino la inhibición que provoca el L-malato en la actividad de la enzima a una concentración dada de L-malato y a pH subóptimo de 7,3. La actividad PEPC determinada en estas condiciones, tuvo comportamientos diferentes según la campaña estudiada. En la primera campaña, las actividades en presencia de málico van en el sentido de la bibliografía y coinciden ampliamente con los otros dos parámetros (Tabla 5.2). Es decir, una menor inhibición de la actividad en presencia de málico para una enzima fosforilada. Podemos concluir que en la primera campaña, los parámetros relacionados con la fosforilación eran coincidentes. Pero en la segunda y la tercera campaña, la sensibilidad al málico presenta correlaciones opuestas con los otros dos parámetros indicadores de fosforilación. Con frecuencia, los datos de la literatura muestran que la enzima fosforilada disminuye su sensibilidad al efector negativo L-malato (Chollet et al. 1996; Echevarría et al. 1994; Wang et al. 1994). Pero en ensayos de respuesta a altas temperaturas en hojas de plantas  $C_3$  y  $C_4$  llevados a cabo por Chinthapalli y su equipo (Chinthapalli et al. 2003) ha sido medida la disminución a la sensibilidad al málico al aumentar la temperatura de la hoja. Las altas temperaturas en las hojas inducen cambios en la PEPC que la desensibilizan frente al málico, sin embargo, en este caso y según muestran los autores con experimentos de marcaje in vivo de la PEPC con  $^{32}P$ , en esta disminución de la sensibilidad al málico no está involucrada la fosforilación de la PEPC (Chinthapalli et al. 2003). Estas observaciones podrían explicar el comportamiento anómalo de la sensibilidad al málico respecto al estado de fosforilación de la enzima, precisamente en la segunda y la tercera campaña, cuando más drástico fue el efecto de la temperatura sobre las plantas.

### 3. ¿Qué factores influyen en el grado de fosforilación de la PEPC en la raíz de remolacha?

Según lo mostrado de que el grado de activación en presencia de glucosa-6P y la relación entre la actividad pH 8/pH subóptimos indican también en la raíz de *Beta vulgaris* el nivel de fosforilación de la enzima, la **PEPC estaría más fosforilada:**

- En la primera campaña, a partir del 4º muestreo (mes de junio-julio) en todos los tratamientos y en el tratamiento T2 en todos los muestreos.
- En la segunda campaña a lo largo de todos los muestreos.
- En la tercera campaña, en el control y en T2 más que en T3.

Cabe destacar la diversidad de correlaciones que presenta la activación de la PEPC (activación con glucosa-6P, pH8/pHs subóptimos) con el resto de parámetros estudiados. Las condiciones diferenciales y determinantes de cada campaña, modulan la respuesta de la planta respecto a la fosforilación de la PEPC. Se analizó la relación de estos parámetros con el resto de parámetros estudiados para determinar en qué condiciones se veía **favorecida la fosforilación de la PEPC**:

- En las dos primeras campañas por el estrés ambiental relacionado con el déficit hídrico: aumento de la temperatura mínima, media o máxima, aumento de la polarización o el N- $\alpha$  amino.
- En las dos primeras campañas, por la disminución del nitrógeno presente en la planta (N-total, en limbos y en materia seca en la 1ª campaña, N en jugo de peciolos en la 2ª).
- En la segunda y la tercera campaña, por el aumento de producción de la planta, parámetros relacionado con el crecimiento del cultivo.

Ha sido descrito un aumento de la actividad PEPC y de la PPCK en condiciones de sequía y estrés osmótico. En *A. thaliana* se ha descrito el aumento de algunas de las isoformas de PEPC, especialmente en las raíces, en respuesta al estrés salino y por sequía. Entre las isoformas altamente transcritas estaría la tipo bacteriana, que no tiene dominio de fosforilación (Sánchez & Cejudo 2003). También se han detectado importantes aumentos de la transcripción y de la actividad PEPC en raíces de trigo sometidas a estrés osmótico y salino (González et al. 2003). En hojas de sorgo se ha documentado el aumento de la PPCK en respuesta al estrés salino y la fosforilación de la PEPC de sorgo, en condiciones de oscuridad y estrés osmótico (García-Mauriño et al. 2003; Echevarría et al. 2001). Estas observaciones concuerdan con las correlaciones obtenidas entre los parámetros de la regulación de la PEPC por fosforilación y el resto de variables estudiadas.

Los datos obtenidos indicarían una compleja modulación del grado de fosforilación de la PEPC para responder a las diferentes situaciones, aumentando en situaciones que favorezcan el estrés hídrico. La relación con la producción en las dos campañas más estresadas podría estar relacionada con la recuperación foliar que tuvieron que realizar las plantas durante el periodo de estudio por los choques térmicos y/o hídricos a las que fueron sometidas.

### Regulación por monoubiquitinación

Nuestros datos también muestran que en esta modulación de la PEPC en las plantas de remolacha, estaría participando el proceso de monoubiquitinación. En este sentido es importante destacar los resultados observados en los Westerns blot de hojas (Fig. 5.12) y raíces (Fig. 5.13, 5.20). En estas figuras queda constatada la presencia de PEPC monoubiquitinada en las hojas y las raíces de *Beta vulgaris*. Esa monoubiquitinación ha sido detectada en extractos clarificados de diferentes plantas, incluyendo hojas C3, células de la guarda, raíces y frutos (Denecke et al., 1993; Law & Plaxton, 1997; De Nisi & Zocchi, 2000; Rao et al., 2006), y durante el desarrollo y germinación de la semilla de cereales, como en trigo, cebada y sorgo (Osuna et al., 1996; González et al., 1998; Nhiri et al. 2000; Ferial et al., 2008; Ruiz-Ballesta et al., 2014).

En primer lugar cabe destacar las diferencias en el patrón de monoubiquitinación de hojas y raíces. Las hojas muestran la PEPC monoubiquitinada, en igual proporción de proteína ubiquitinada y sin ubiquitinar (Figura 5.12). Las raíces en cambio, muestran monoubiquitinación pero en menor proporción que la enzima sin Ub (banda más tenue, Fig. 5.13, Fig. 5.20), en ocasiones la banda es inapreciable.

En la raíz, la aparición de la banda superior de PEPC ubiquitinada (PEPC-Ub), sigue patrones diferentes en cada condición de ensayo. Durante la primera campaña se hace más evidente en los primeros y últimos muestreos de las condiciones. En la condición T3 no se distingue la banda Ub-PEPC (Fig. 5.13). Durante la segunda campaña está más presente en el control que en T3 (Fig. 5.20), aunque las diferencias son muy ligeras.

En el endospermo de semillas germinadas de ricino, se descubrió por primera vez la monoubiquitinación reguladora en una enzima metabólica, es decir, en la PEPC (Uhrig et al. 2008). En nuestros resultados, la desigual presencia de la PEPC-Ub en los diferentes tratamientos, podría indicar que la monoubiquitinación está, al menos en parte, determinada por las condiciones ambientales. Serán necesarios más estudios para determinar los contextos fisiológicos en los que las plantas utilizan este mecanismo de regulación y como interactúa la ubiquitinación de la PEPC con el resto de mecanismos de regulación de la enzima. Sin embargo, estos resultados muestran que en remolacha, en las condiciones estudiadas en esta campaña, es la PEPC de hojas la que se encuentre preferentemente en estado heterotetramérico con una proporción 1:1 de enzima ubiquitinada y desubiquitinada, mientras que en la raíz se encontraría en su forma homotetramérica, con una presencia baja del heterotetrámero que aparece de forma débil en algunos muestreos y está ausente en el T3 de la campaña 1ª. Además, podemos afirmar que los tratamientos de golpe de calor no indujeron la monoubiquitinación de la PEPC.

### PEPC y resistencia térmica

En la tercera campaña se determinó la actividad PEPC de los diferentes ensayos a tres temperaturas diferentes: 30 °C, 40 °C, 50 °C. La figura 5.31 se muestra el efecto diferencial de estas tres temperaturas a lo largo de los muestreos en función del tratamiento. Los resultados han mostrado que en los tres tratamientos la actividad de la PEPC de raíz de remolacha muestra una temperatura óptima de 40 °C en la mayoría de los muestreos. La resistencia *in vitro* a la temperatura de la PEPC ha sido estudiada comparando plantas C<sub>3</sub> y plantas C<sub>4</sub>, siendo estas últimas las que presentaba una mayor temperatura óptima (45 °C para la PEPC C<sub>4</sub> y 30 °C para la PEPC C<sub>3</sub>) (Chinthapalli et al. 2003). Nuestros datos muestran para la PEPC de raíz mantiene una elevada proporción de su actividad en un medio a 50 °C y que además, el grado de actividad a esta T<sup>a</sup> está directamente correlacionado con la temperatura máxima soportada por la planta (Tabla 5.12, fila 1). Nuestros ensayos fueron realizados con plantas sometidas a altas temperaturas, que podrían haber generado un proceso de aclimatación. Esto se hace evidente en los datos de la figura 5.31 y en la tabla 5.11 donde se muestra que en la condición T3 (la que mayor estrés térmico sufrió), la enzima mantiene una mayor actividad a 50 °C. Estos datos ratifican el proceso de aclimatación de la planta en esta condición que induce mayor resistencia térmica en la PEPC de raíz. Las correlaciones de la actividad PEPC a 50 °C (Tabla 5.12) la relacionan de forma directa con el aumento de prolina y de sodio, indicando la implicación la protección osmótica en esta resistencia a la temperatura. La modulación de la enzima generando mejores respuesta a mayores temperaturas e iluminación se ha puesto en evidencia en plantas C<sub>4</sub> en condiciones naturales de crecimiento (Avasthi et al. 2011).

Aunque se ha descrito que en la activación por temperatura no está involucrada la fosforilación (Chinthapalli et al. 2003), no ha sido estudiado cómo influye el nivel de fosforilación de la enzima a la resistencia térmica. Ya ha sido discutido que en las condiciones de esta tercera campaña, T3, el tratamiento con mayor estrés térmico desligado del estrés hídrico era el que presentaba un menor grado de fosforilación de la PEPC. T3 es además el tratamiento en el que la PEPC muestra una mayor resistencia térmica *in vitro* (Tabla 5.11). Estos datos apoyan que la enzima desfosforilada presentaría una mayor tolerancia a las altas temperaturas. Las correlaciones establecidas con el resto de parámetros también aportan evidencias de este fenómeno. En la tabla 5.12, las correlaciones con los parámetros agronómicos y metabólicos aportan que la PEPC presentaría una mayor actividad a 40 °C cuando:

- Aumenta la producción de hojas, la cobertura, el LAI.
- Aumenta la actividad sacarosa sintasa y el potasio
- La planta presenta una menor integral térmica (cultivo más joven).

Estos parámetros han sido relacionados con una mayor cantidad de enzima (actividad a pH 8) y/o una menor activación por fosforilación a lo largo de las campañas, reforzando la relación inversa entre el grado de fosforilación de la enzima y la aclimatación térmica.

#### 4.6. Los adenilatos como índice de la actividad metabólica de la raíz

---

Los niveles de adenilatos en la raíz acumuladora están determinados principalmente por el programa de desarrollo de la planta en interacción con amplios cambios ambientales (fotoperiodo, tendencias de las temperaturas). Sin embargo, cuando el sistema metabólico de la raíz está activo, como sucede en las plantas de siembra otoñal en recolección, pueden detectarse variaciones en los niveles de adenilatos en respuesta a situaciones puntuales de estrés (Jiménez 2004). En general una relación ATP/ADP alta sugiere una situación de alta actividad metabólica (García-Mauriño et al. 2005a). Durante las dos campañas en la que se midieron estos parámetros, **1ª campaña y 2ª campaña** se observó que los valores de ATP y ADP obtenidos fueron en general, mucho más bajos que los de las anteriores campañas muestreadas por nuestro grupo (del orden de 10 veces menores) (García-Mauriño et al. 2005b). Esto podría deberse a que esta variedad funciona a una menor tasa metabólica o a las condiciones climáticas características similares a los de la variedad Ramona estudiada en anteriores campañas (García-Mauriño et al. 2005b).

Durante la **1ª campaña** los valores de ATP y ADP en la raíz de remolacha van descendiendo hasta junio en las tres condiciones de manejo (Fig. 3.1 A y B) y presentan altas oscilaciones en la relación ATP/ADP (Fig. 3.1 C) lo que indica una alta tasa metabólica en la raíz. Esto es debido posiblemente a que este órgano se encuentra en crecimiento. A partir del 7 de junio (5º muestreo) va aumentando el contenido en ATP y en ADP y se estabiliza la relación ATP/ADP. Esta combinación muestra que la raíz se encuentra en un periodo de estabilidad metabólica, dónde no se produce nueva síntesis de biomasa. Podría coincidir con el comienzo del periodo de acumulación. También indicaría que las raíces no se encuentran sometidas a estrés. En el último muestreo (11 de julio) esta situación varía ligeramente, observándose un ligero aumento de la relación ATP/ADP. Ha sido descrito que en el momento precosecha, las remolachas de siembra otoñal presentan un metabolismo activo, capaz de variar en respuesta al estrés. En el momento de la cosecha, las remolachas de siembra otoñal acumulan mayor cantidad de prolina y de glucosa en las raíces que las de siembra primaveral. Ambos metabolitos están asociados al estrés: la prolina se acumula como osmolito compatible para restaurar el equilibrio hídrico y la glucosa que indicaría una movilización de la sacarosa (Echevarría & Morillo-Velarde 2005). En este último muestreo de la primera campaña en la condición control se dan dos de las situaciones anteriormente descritas: aumenta la relación ATP/ADP y la cantidad de prolina, que presenta los máximos de la campaña en el último muestreo (Fig. 4.1).

En general, los valores de la relación ATP/ADP de esta campaña son bajos, y se puede considerar que están en relación a una baja situación de estrés de la planta durante la fecha de recolección, datos que están de acuerdo con las condiciones climáticas suaves de los meses de junio y julio del periodo de recolección de la remolacha de esta primera campaña (ver capítulo 1.1, datos climáticos).

La segunda campaña mantuvo prácticamente en todos los muestreos unos valores muy bajos de ADP y por lo tanto una alta relación ATP/ADP, que indica una mayor actividad metabólica que en la campaña anterior (Fig.3.2). Las diferencias significativas que muestran los niveles de adenilatos en el tratamiento más estresado (T3) y sus mayores valores de ATP muestran que T3 fue la condición con mayor actividad metabólica. Valorando los resultados ya discutidos, estos niveles de adenilatos en esta campaña y en este tratamiento, se corresponden con la respuesta al estrés que estaban desarrollando las plantas de esta segunda campaña, y que su metabolismo activo les permite llevar a cabo. Esto se ve reforzado por los datos de adenilatos del ensayo hídrico, donde de nuevo la condición más estresada, secano (Fig.3.3, secano) presenta la combinación que indica una mayor tasa metabólica. Es destacable el efecto de una mejora en las condiciones ambientales sobre este parámetro, observada durante el 4º muestreo, que pone de manifiesto la capacidad de los adenilatos para responder a situaciones puntuales de estrés en las remolachas de siembra otoñal.







## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

- 1) Ligeros aumentos en las temperaturas ( $\Delta 2-3^{\circ}\text{C}$ ) en la época de crecimiento del cultivo (abril-mayo) disminuyen el área foliar y generan pérdidas de polarización (concentración de sacarosa) a corto plazo.
- 2) Un perfil hídrico del suelo deficiente al comienzo de la época de riegos, combinado con temperaturas por encima de  $40^{\circ}\text{C}$  durante varios días, generan un importante impacto en el cultivo de la remolacha produciendo una importante caída de la producción foliar y la consecuente pérdida de cosecha (disminución de más del 50% de la producción de raíz  $\text{Ha}^{-1}$ ).
- 3) Un adecuado perfil hídrico del suelo combinado con temperaturas por encima de  $40^{\circ}\text{C}$  durante varios días, genera cambios en la morfología de la hoja, aumentando el peciolo y disminuyendo el limbo además de descender la producción foliar.
- 4) La pérdida de superficie fotosintéticamente activa producida por los golpes de calor, restringe el aporte de fotosintatos a la raíz, disminuyendo el crecimiento del sumidero, la biomasa de raíz ( $\text{t Ha}^{-1}$ ) y la producción de azúcar por hectárea, pero no genera variaciones importantes en la concentración de sacarosa en las raíces (polarización).
- 5) El efecto inmediato de los golpes de calor es más evidente sobre un mayor número de parámetros agronómicos, cuando se produce en etapas más tempranas del desarrollo del cultivo (abril). Con una buena disponibilidad hídrica, en etapas jóvenes del cultivo, los golpes de calor tienen un efecto significativamente menor en los parámetros agronómicos de la remolacha.
- 6) Cuando la planta está sometida a estrés hídrico y térmico (2ª campaña), disminuye su área foliar y aumenta la producción de sustancias protectoras como es la prolina en la raíz. Se muestra que este osmolito es buen marcador del estado hídrico de las raíces de remolacha azucarera. Además, la acumulación de prolina en los diferentes órganos es dependiente del órgano que reciba la señal de deshidratación, hoja o raíz, alta temperatura o déficit hídrico respectivamente.
- 7) Los patrones de distribución de prolina en hojas y raíces, así como los contenidos netos alcanzados en cada órgano están estrechamente relacionados con el historial de riego de la planta y con sus procesos de aclimatación.

- 8) La adaptación al estrés térmico implica una mayor cantidad de proteínas en la raíz y el aumento de glucosa en la época central del cultivo.
- 9) El déficit hídrico y/o térmico sufridos en la 2ª y la 3ª campaña durante la época de crecimiento, aumentaron la relación ATP/ADP en la raíz de remolacha lo que indica una alta actividad metabólica.
- 10) La actividad **sacarosa sintasa** en la raíz tiene un importante papel en la regeneración foliar y de raíz, tras las pérdidas producidas por golpe de calor, cuando esta se produce en etapas jóvenes del cultivo. Por el contrario, la SS disminuye su actividad en el periodo de concentración de sacarosa. En esta función se coordina con la actividad invertasa neutra.
- 11) La actividad **PEPC** muestra importantes correlaciones con el nitrógeno inorgánico incorporado por la planta, las proteínas y el  $K^+$ . Además, la **PEPC** mantiene alta su actividad en el mismo momento fenológico que la SS, siendo mayor en los periodos de crecimiento activo de la planta.
- 12) La **PEPC** en la raíz de la remolacha azucarera, en las condiciones estudiadas, es activada por fosforilación en situaciones de estrés hídrico y pero no de estrés térmico. Además, está regulada por monoubiquitinación siendo ampliamente monoubiquitinada en la hoja y poco en la raíz, independientemente de los golpes de calor o estrés hídrico.
- 13) Los resultados de este trabajo ponen de relevancia la importancia del control de los riegos a través de indicadores de la propia planta (prolina, glucosa, brix del peciolo) y no sólo de los climáticos. Su aplicación permitiría la optimización de los recursos hídricos y la anticipación necesaria en situaciones climáticas poco predecibles (golpes de calor en la primavera andaluza) para evitar graves pérdidas en la producción de raíz.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Agetsuma, M. et al., 2005. The Arabidopsis thaliana ubiquitin-proteasome pathway is involved in rapid degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase for C4 photosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 46, pp.389–398.
- Agrodigital, 2015. Azucarera inicia la contratación de remolacha en la zona norte. *Agrodigital.com*.
- AIMCRA, 2006. Efecto del estrés térmico sobre la remolacha de siembra otoñal. Memoria de la campaña 2005/2006. Zona sur. Eds: AIMCRA.  
[http://www.aimcra.es/Publicaciones/Documentos/MemoriasSur/Memoria\\_Sur\\_2005.pdf](http://www.aimcra.es/Publicaciones/Documentos/MemoriasSur/Memoria_Sur_2005.pdf)
- Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M. & Barradas, M., 2001. Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant and Soil*, pp.175–183. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1010387610098>.
- Allen, R.G. et al., 1998. Crop Evapotranspiration (guidelines for computing crop water requirements). *FAO Irrigation and Drainer Paper*, pp.56.
- Álvarez, R., León, A., Echevarría, C., 2005. La fosfoenolpiruvato carboxilasa en relación con la nutrición nitrogenada y con el estrés hídrico y térmico. *Actas IX Congreso Luso Español de Fisiología Vegetal. XVI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal*, pag. 66.
- AMI, 2002. Acuerdo marco interprofesional del ámbito nacional para la campaña 2002-2006. Ed. Federación de grupos remolacheros, pp.48.
- Amor, Y. et al., 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp.9353–9357.
- Andersen, M.N. et al., 2002. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant physiology*, 130(2), pp.591–604.
- Andreo, C., González, D. & Iglesias, A., 1987. Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase, structure and regulation. *FEBS Lett*, 213, pp.1–8.



- Antolín, M.C. & Sánchez-Díaz, M., 1993. Effects of Temporary Droughts on Photosynthesis of Alfalfa Plants. *Journal of Experimental Botany*, 44(8), pp.1341–1349.
- Aubert Y., Vile D., Pervent M., Aldon D., Ranty B., Simonneau T., Vavasseur A. y Galaud J.P., 2010. RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance. *Arabidopsis thaliana. Plant and Cell Physiology* 51, 1975–1987.
- Avasthi, U.K., Izui, K. & Raghavendra, A.S., 2011. Interplay of light and temperature during the in planta modulation of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase from the leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L.: Diurnal and seasonal effects manifested at molecular levels. *Journal of Experimental Botany*, 62 (3), pp.1017–1026.
- Ayres, M.P. & Lombardero, M.J., 2000. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *Science of the Total Environment*, 262(3), pp.263–286.
- Balibrea Lara, M.E. et al., 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant cell*, 16(May), pp.1276–1287.
- Bakrim, N., Echevarría, C., Cretin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J.N., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., 1992. Regulatory phosphorylation of Sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Identification of the protein-serine kinase and some elements of the signal-transduction cascade. *European Journal Biochemistry* 204, pp.821–830.
- Baroja-Fernández, E. et al., 2003. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant and Cell Physiology*, 44(5), pp.500–509.
- Barratt, D. et al., 2009. Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, pp.13124–29.
- Barrero-Sicilia, C. et al., 2011. Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley. *Planta*, 234(2), pp.391–403.
- Bartlett, M.K., Scoffoni, C. & Sack, L., 2012. The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: A global meta-analysis. *Ecology Letters*, 15(5), pp.393–405.

- Berghall, S. et al., 1997. The role of sugar beet invertase and related enzymes during growth, storage and processing. *Zuckerind*, 122, pp.520–530.
- Bermejo Corrales, J., 2015. Producción integrada en Andalucía en la campaña 2014-2015. *Revista AIMCRA*, p.4.
- Bernacchi, C.J. et al., 2001. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 24(2), pp.253–259.
- Berry, J. & Björkman, O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 31, pp.491–543.
- Besnard, G. et al., 2003. Characterisation of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Theor Appl Genet*, 107, pp.470–478.
- Bieniawska, Z. et al., 2007. Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J*, 49, pp.810–28.
- Bloch, D., Hoffmann, C.M. & Märlander, B., 2006. Impact of water supply on photosynthesis, water use and carbon isotope discrimination of sugar beet genotypes. *European Journal of Agronomy*, 24(3), pp.218–225.
- Blonde, J. & Plaxton, W., 2003. Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oil seeds. *J Biol Chem*, 278, pp.11867–73.
- Boese S.R. y Huner N.P.A., 1990. Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photo- synthesis. *Plant Physiology*, 94, pp. 1830–1836.
- Bogeat-Triboulot, M. et al., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, 143, pp.876–892.
- Borisjuk, L. et al., 2002. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant Journal*, 29, pp.521–530.
- Borisjuk, L. et al., 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54, pp.503–5012.

- Boyer, J.S., 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, a(46), pp.233–235.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4571), pp.443–448.
- Boyer J.S., 1985. Water transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 36, pp.473–516.
- Brown, K.W, Rosenberg, N.J., 1971. Energy and CO<sub>2</sub> balance of an irrigated sugar beet (*Beta vulgaris*) field in the Great Plains. *Agronomy Journal*, 63, pp.207-213.
- Brugiere, N. et al., 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *The Plant cell*, 11(10), pp.1995–2012.
- Buckeridge M, Vergara C, Carpita N., 1999. The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1 →3),(1 →4)β-D-glucan in maize. Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiol*, 120, pp.1105–1116.
- Bukhov N.G., Bondar V.V., Drozdova I.S., 1995. Long-term effects of blue or red light on ATP and ADP contents in primary barley leaves. *Planta*, 196, pp.211–216.
- Champigny, M. & Foyer, C., 1992. Nitrate activation of cyclosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basis for a new concept. *plant Physiol*, 100, pp.7–12.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T. & Pinheiro C., 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* , 89, pp.907–916.
- Cheng, W., Tallercio, E. & Chourey, P., 1996. The Miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell*, 8, pp.971–83.
- Cheng, W.H. & Chourey, P.S., 1999. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, pp.485–495.
- Ching. T.M., Kronstadt, W.E., 1972. Varietal differences in growth potential, adenylate energy level and energy charge of wheat. *Crop Science*. 12, pp.785–789.

- Chinthapalli, B., Murmu, J. & Raghavendra, A.S., 2003. Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C3 and C4 plants. *Journal of Experimental Botany*. pp?
- Chollet, R., Vidal, J. & O'Leary, M.H., 1996. PHOSPHO ENOL PYRUVATE CARBOXYLASE: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), pp.273–298. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.47.1.273>.
- Chołuj, D. et al., 2008. Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), pp.679–687. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-008-0166-2>.
- Chourey, P. et al., 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 259, pp.88–96.
- Ciais, P. et al., 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437(7058), pp.529–533.
- Clarke, N. et al., 1993. Identification of Stress Tolerance Traits in Sugar Beet. *Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate*, 16, pp.511–524.
- Coleman, H., Yan, J. & Mansfield, S., 2009. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 106, pp.13118–23.
- Cook, Dixon y Leopold 1964 (Intro p19)
- Coursol, S. et al., 2000. An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH<sub>4</sub>Cl-treated protoplasts from *Digitaria Sanguinalis*. *Plant*, 23, pp.497–506.
- Covey-Crump, E.M., Attwood, R.G. & Atkin, O.K., 2002. Regulation of root respiration in two species of *Plantago* that differ in relative growth rate: the effect of short- and longterm changes in temperature. *Plant Cell Environt*, 25, pp.1501–1513.

- Cramer, G. et al., 2007. Water and salinity stress in grapevines, early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional and Integrative Genomics*, 7, pp.111–134.
- Delauney, A. & Verma, D., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4(2), pp.215–223. Available at:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x/abstract>.
- Demmers-Derkes, H. et al., 1998. Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) yield and biochemical composition to elevated CO<sub>2</sub> and temperature at two nitrogen applications. *Plant, Cell and Environment*, 21, pp.829–836.
- Denecke, M. et al., 1993. Partial purification and characterization of stomatal phosphoenolpyruvate carboxylase from *Vicia faba*. *Physiol Plant*, 87, pp.1996–2012.
- Dever, L. et al., 1995. The isolation and characterization of mutants of the C<sub>4</sub> photosynthetic pathway. *Plant Cell Rep*, 46, pp.1363–76.
- Diego, S. & Jolla, L., 1972. The Purification and Properties of Sucrose Etiolated Phaseok aureus Seedlings \* Synthetase from., (12), pp.3822–3828.
- Downes, B. & Vierstra, R., 2005. Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. *Biochem Soc Trans*, 33, pp.393–399.
- Duff, S. & Chollet, R., 1995. In-vivo regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plan Physiol*, 107, pp.775–782.
- Dunham, R. & Clarke, N.A., 1992. Coping with Stress. *British Sugar Beet Review*, 66, pp.10–13.
- Echevarría, C. et al., 1994. The effect of pH on the covalent and metabolic control of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from Sorghum leaf. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(2), pp.425–430.
- Echevarría, C. et al., 2001. Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in Sorghum leaves. *Planta*, 214(2), pp.283–287. Available at:  
<http://link.springer.com/10.1007/s004250100616>.
- Echevarría, C. & Vidal, J., 2003. The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 4(6-7), pp.541–547. Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942803000688>.

- Echevarría, C. & Morillo-Velarde, R., 2005. *Aspectos Fisiológicos de la Remolacha Azucarera de Siembra Otoñal*. J. de A. C. de A. y Pesca., ed., Sevilla: Viceconsejería. Servicio de publicaciones y divulgación.
- Ehlig, C.F. & LeMert, R.D., 1979. Water Use and Yields of Sugarbeets Over a Range from Excessive to Limited Irrigation. *Soil Science Society of America Journal*, 43(2), pp.403–407.
- Escherich, W (1980). Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber Deut Bot Ges* 93,363–378.
- Etxeberria, E. & Gonzalez, P., 2003. Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. *Journal of Experimental Botany*. pp?
- Fallahi, H. et al., 2008. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Exp. Bot.*, 59, pp.3283–95.
- Fan, L. & Neumann, P., 2004. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. *Plant Physiology*, 135, pp.2291–2300.
- FAO. 2015. Base de datos FAOSTAT en línea, disponible en el enlace <http://faostat.fao.org/>. Consultada en octubre de 2015.
- Feria, A. et al., 2008. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and abscisic acid during the development and germination of barley seeds. *Plant Physiol*, 148, pp.761–774.
- Flexas, J. et al., 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *The New phytologist*, 172(1), pp.73–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945090>.
- Fu, Q.A., & Ehleringer, J.R., 1989. Heliotropic leaf movements in common beans controlled by air temperature. *Plant Physiology*, 91, pp.1162–1167.

- García-Mauriño, S. et al., 2003. Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence from osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta*, 216(4), pp.648–655.
- García-Mauriño, S., Jiménez, E.T., et al., 2005a. Adenylate patterns of autumn-sown sugar beet differ from spring-sown sugar beet. Implications for root quality. *Physiologia Plantarum*, 124. pp.200–207.
- García-Mauriño, S., Jiménez, E.T., et al., 2005b. Los niveles de adenilatos reflejan mayor actividad metabólica y mayor capacidad respiratoria en la remolacha otoñal respecto a la primavera. In *Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal*. Sevilla: Viceconsejería. Servicio de publicaciones y divulgación, pp. 71–80.
- Ghoulam, C., Foursy, A. & Fares, K., 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47, pp. 39–50.
- Giaquinta, R.T., 1979. Sucrose translocation and storage in the sugar beet. *Plant physiology*, 63, pp.828-832.
- Gilioli-Guivarc'h, N. et al., 1996. The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C4-phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria Sanguinalis*. *Plant Cell*, 8, pp.573–586.
- González, M. et al., 1998. Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains. *Plant Physiol*, 116, pp.1249–58.
- González, M.-C., Sánchez, R. & Cejudo, F.J., 2003. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 216(6), pp.985–992.
- González, M.C. et al., 2005. Una estrategia para la inhibición del espigado de la remolacha de siembra otoñal. In *Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal*. Sevilla: Viceconsejería. Servicio de publicaciones y divulgación, pp. 133–142.
- Gordo, L., 2003. *La calidad tecnológica de la remolacha azucarera*. Ed. Artes, Valladolid.

- Gousset-Dupont, A. et al., 2005. Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 169, pp.1096–1101.
- Gregory, A. et al., 2009. In vivo regulatory phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase AtPPC1 in phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.*, 420, pp.57–65.
- Grover, A. et al., 2000. Production of high temperature tolerant transgenic plants through manipulation of membrane lipids. *Current Science*, 79(5), pp.557–559.
- Gutierrez Sosa, M., 2015. Calidad tecnológica de la remolacha azucarera: influencia de los factores de cultivos manejables y no manejables. *Revista AIMCRA*, 121, pp.10–14.
- Gzik, A., 1996. Accumulation of proline and pattern of ??-amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 36, pp.29-38.
- Haagensohn, D.M., Klotz, K.L. & McGrath, J.M., 2006. Sugarbeet sucrose synthase genes differ in organ-specific and developmental expression. *Journal of Plant Physiology*, 163, pp.102-106.
- Haigler, C.H., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P.S., Salnikov, V.V., Hwang, S., Martin, K., Delmer, D.P., 2001. Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Molecular Biology* 47, pp.29–51.
- Ben Haj Salah, H. & Tardieu, F., 1997. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. A superposition of hydraulic and chemical messages? *Plant Physiology*, 114, pp.893–900.
- Hajheidari, M. et al., 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), pp.950–960.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurrea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Zhang, Y., Paul, M.J., 2004. Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55, pp.35-42.



- Hanks, R.J. et al., 1981. Predicting crop production as related to drought stress under irrigation. *Reporte de Investigación 65 de la Estación Experimental de Agricultura de Utah*, 65, pp.17–202.
- Hanson, A.D. & Hitz, W.D., 1982. Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, pp.163–203.
- Hardin, S.C. et al., 2003. Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: Occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant Journal*, 35, pp.538–603.
- Hardin, S. C., Duncan, K. A., & Huber, S. C. (2006). Determination of structural requirements and probable regulatory effectors for membrane association of maize sucrose synthase 1. *Plant Physiology*, 141, pp. 1106–1119. <http://doi.org/10.1104/pp.106.078006>
- Hasegawa, P.M. et al., 1994. Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. In A. R. Y. and T. J. Flowers, ed. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics: Soil Mineral Stresses - Approaches to Crop Improvement*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, pp. 83–125.
- Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, pp.425–479.
- Hewitt, E.J. (1966). The composition of the micronutrient solution. Sand and water culture methods in the study of plants nutrition. *Commonwealth Agricultural Bureaux of Horticulture and Plantation Crops*. Technical Communication 22. Farnham Royal, England.
- Heyer, A. et al., 2004. Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 39, pp.161–69.
- Hoffmann, C.M., Kenter, C. & Bloch, D., 2005. Marc concentration of sugar beet (*Beta vulgaris* L) in relation to sucrose storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, pp.459–465.
- Hoffmann, C.M. et al., 2009. Impact of different environments in Europe on yield and quality of sugar beet genotypes. *European Journal of Agronomy*, 30(1), pp.17–26.

- Hoffmann, C.M., 2010. Sucrose accumulation in sugar beet under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(4), pp.243–252.
- Hsiao, T., 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, pp.519–570.
- Huber, S.C., Sugiyama, T., 1986. Changes in sensitivity to effectors of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transitions. *Plant Physiology*, 81, pp.674–77.
- Huber, S.C. et al., 1996. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant physiology*, 112, pp.793–802.
- Hummel, I. et al., 2010. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. *Plant Physiology*, 154(1), pp.357–372.
- Huppe, H. & Urpin, D., 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant. Physiol Plant Mol Biol*, 45, pp.577–607.
- Iannucci, a et al., 2000. Physiological responses to water stress following a conditioning period in berseem clover. , pp.217–227.
- Iba, K., 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53, pp.225–45.
- Infoagro, 2012. El cultivo de la remolacha azucarera.I. *Infoagro.com*.
- IPCC, 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Izui, K. et al., 2004. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, pp.69–84.
- Janes, B.E., 1974. The effect of molecular size, concentration in nutrient solution, and exposure time on the amount and distribution of polyethylene glycol in pepper plants. *Plant physiology*, 54(3), pp.226–230.

- Jawali, N., 1990. The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: physical and kinetic properties. *Arch Biochem Biophys.*, 277, pp.61–68.
- Jeanneau, M. et al., 2002. Manipulating PEPC levels in plants. *J Exp Bot*, 53, pp.1837–45.
- Jenks M.A. & Wood A.J. (eds) (2010) *Genes for Plant Abiotic Stress*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK
- Ji, X. et al., 2005. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. *J. Mol. Evol.*, 60, pp.615–34.
- Jia, L. et al., 2008. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 228(1), pp.51–59. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-008-0718-0>.
- Jiang, Y. & Huang, B., 2001. Osmotic adjustment and root growth associated with drought preconditioning-enhanced heat tolerance in Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 41(4), pp.1168–1173.
- Jiang, Y. et al., 2012. Overexpression of GhSusA1 increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality. *Plant Biotechnol J.*, 10, pp.301–12.
- Jiao, J-A. & Chollet, R., 1991. Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> and Crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiology*, 95, pp.981-985.
- Jiménez Segovia, E.T., 2004. Factores ambientales y fisiológicos que influyen en la riqueza y la calidad de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Available at: <http://tesisenred.net/handle/10803/114541> [Accessed July 8, 2015].
- Jin, Y., Ni, D. & Y-L, R., 2009. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *Plant Cell*, 21, pp.2072–89.
- John, P., 1992. *Biosynthesis of the major crop products*. Eds: J.Wiley and sons. England.
- Johnson, I.R. & Thornley, J.H.M., 1985. Temperature Dependence of Plant and Crop Process. *Annals of Botany*, 55(1), pp.1–24.
- Kai, Y., Matsumura, H. & Izui, K., 2003. Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Arch Biochem Biophys.*, 414, pp.170–179.

- Kaiser, W., 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71, pp.142–149.
- Katerji, N. et al., 1997. Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield. *Agricultural Water Management*.
- Kim, J.Y. et al., 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant physiology*, 124(1), pp.71–84.
- Kishor, P. et al., 1995. Overexpression of [delta]-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant physiology*, 108(4), pp.1387–1394.
- Klann, E., Chetelat, R. & Bennett, A., 1993. Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiol.*, 103, pp.863–70.
- Klann, E., Hall, B. & Bennett, A., 1996. Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol.*, 112, pp.1321–30.
- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulates gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, pp.509–540.
- Koch, K.E. et al., 2000. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of experimental botany*, 51 Spec No(February), pp.417–427.
- Koch, K. & Zeng, Y., 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism, 127 (2002), pp. 474–483. *J Amer Soc Hort Sci*, 127, pp.474–483.
- Koch, K., 2004a. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), pp.235–246. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526604000469> [Accessed September 21, 2015].
- Koch, K., 2004b. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, pp.235–46.

- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitlam, G.C. & Franklin, K.A., 2009. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology*, 19, pp.408–413.
- Konishi, T., Ohmiya, Y. & Hayashi, T., 2004. Evidence that sucrose loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various beta-glucan synthases in the stem. *Plant physiology*, 134(3), pp.1146–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=389938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Körner, C., 2006. Significance of temperature in plant life. In *Plant Growth and Climate Change*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, pp. 48–69.
- Kramer, P. & Turner, N., 1980. Drought stress and the origin of adaptations. In E. NC Turner and PJ Kramer, ed. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. New York, pp. 7–20.
- Kuroyanagi, T. & Paulsen, G.M., 1988. Mediation of high- temperature injury by roots and shoots during reproductive growth of wheat. *Plant, Cell & Environment*, 11, pp.517–523.
- Lafta, A.M. & Lorenzen, J.H., 1995. Effect of High Temperature on Plant Growth and Carbohydrate Metabolism in Potato. *Plant physiology*. nº y pp?
- Lagerwerff, J.V., Ogata, G. & Eagle, E., 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*, 133, pp.1486-1487.
- Latzko, E. & Kelly, G., 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiol Veg*, 21, pp.805–815.
- Law, R. & Plaxton, W., 1997. Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by a copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. *Eur J. Biochem.*, 247, pp.642–651.
- Lecoeur, J., Wery, J., Turc, O. & Tardieu F., 1995. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany*, 46, pp.1093–1101.

- León, A. et al., 2006. Acumulación diferencial de prolina en los órganos de la remolacha en respuesta a señales de estrés distintas. In *VIII Simposium Hispano-Portugués de relaciones hídricas en las plantas*. Puerto de la Cruz, Tenerife, pp. 71–74.
- Li, B., Zhang, X. Q., & Chollet, R. (1996). Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase in Tobacco Leaves Is Activated by Light in a Similar but Not Identical Way as in Maize. *Plant Physiology*, 111, pp.497-505.
- Liu, F., Jensen, C. & Andersen, M., 2004. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research*, 86(1), pp.1–13.
- Lobell, D.B. & Asner, G.P., 2003. Climate and management contributions to recent trends in US agricultural yields. *Science* 299, pp.1032.
- Lourtie, E., Bonnet, M. & Bosschaert, L., 1995. New glyphosate screening technique by infrared thermometry. *Fourth International Symposium on Adjuvants for Agrochemicals*, (Australia), pp.297–302.
- Loveys, B. et al., 2002. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast and slow growing plant species. *Plant, cell & environment*, 25, pp.975–987.
- Luomala, E.M., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomaki, S. & Vapaavuori E., 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO<sub>2</sub> and temperature. *Plant, Cell & Environment* 28, pp.733– 749.
- Machado, S. & Paulsen, G.M., 2001. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil* 233, pp.179–187.
- MAGRAMA, 2015. Agricultura. Producciones agrícolas cultivos herbáceos. Remolacha azucarera. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/remolacha-azucarera/>.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants* 2nd Academ., London.
- Masumoto, C. et al., 2010. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, pp.5226–31.

- Matsumura, H. et al., 2002. Crystal structures of C4 form maize and quaternary complex of E.coli phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure*, 10, pp.1721–30.
- McCree, K.J. & Richardson, S.G., 1987. Salt Increases the Water Use Efficiency in Water Stressed Plants. *Crop Science*, 27(3), pp.543–547.
- McLAUGHLIN, J.E., 2004. Sugar-responsive Gene Expression, Invertase Activity, and Senescence in Aborting Maize Ovaries at Low Water Potentials. *Annals of Botany*, 94(5), pp.675–689. Available at: <http://aob.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/aob/mch193>.
- McMaster G.S., White J.W., Weiss A., Baenziger P.S., Wilhelm W., Porter J.W. & Jamieson P.D. (2009) Simulating crop phenological responses to water deficits. *Modeling the Response of Crops to Limited Water: Recent Advances in Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes* (eds L.R. Ahuja, V.R. Reddy, S.A. Anapalli & Q. Yu) pp. 277–300. ASA-SSA- CSSA, Madison, WI, USA. McNaughton, G. et al., 1989. Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.*, 261, pp.349–355.
- Mercier, V. et al., 2009. Effects of different irrigation regimes applied during the final stage of rapid growth on an early maturing peach cultivar. *Irrigation Science*, 27(4), pp.297–306. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00271-009-0146-3>.
- Milford, G.F.J. & Riley, J.P., 1980. The effects of temperature on leaf growth of sugar beet varieties. *Annals of Applied Biology*, 94(3), pp.431–443.
- Milford, G.F.J. et al., 1985. An analysis of leaf growth in sugar beet. *Annals of Applied Biology*, 106(1), pp.187–203.
- Mittler, R. et al., 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), pp.300–309. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138511000550>.
- Monreal, J.A. et al., 2007. Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. *Environmental and Experimental Botany*.
- Moraes, T. & Plaxton, W., 2000. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from Brassica napus (rapeseed) suspension cell cultures. Implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with ni. *Eur J. Biochem.*, 267, pp.4465–76.

- Morell, M., Les Copeland, L., 1985. Sucrose Synthase of Soybean Nodules. *Plant Physiology*, 78, pp.149-154.
- Morillo-Velarde, R., Gordo, L. & Bilbao, M., 2001. Agronomía y calidad de la producción de la remolacha azucarera. *Symposium Nacional de Agroquímicos*, 7º, p.11.
- Morillo-Velarde, R. et al., 2005. Respuesta varietal en remolacha azucarera al estrés hídrico. In *Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal*. Sevilla: Viceconsejería. Servicio de publicaciones y divulgación, pp. 153–170.
- Morillo-Velarde, R. & Ober, E., 2006. Water use and irrigation. In *Sugar Beet*,. pp. 221–255.
- Morillo-Velarde, R., 2012. Situación actual y perspectivas para el cultivo de la remolacha azucarera en la presente campaña. *Vida Rural*, Diciembre, pp.49–52.
- Morillo-Velarde, R., 2014. Zona sur.Recomendaciones 2014. *AIMCRA*.
- Moro, J., 1992. Calidad tecnológica de la remolacha en Andalucía. *INIA. Informe técnico*, p.24.
- Mukhopadhyay, D. & Riezman, H., 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 315, pp.201–5.
- Muller, B. et al., 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), pp.1715–1729.
- Müller, C. et al., 2001. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. *Plant Cell Environ*, 24, pp.191–203.
- Murata, T. et al., 1966. Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. 3. Mechanism of the sucrose-starch conversion. *Arch Biochem Biophys.*, Jan;113(1), pp.34–44.
- Murayama, S. & Handa, H., 2007. Genes for alkaline/neutral invertase in rice: Alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta*, 225, pp.1193–203.
- Murmu, J. & Plaxton, W., 2007. Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from developing castor oil seeds: partial purification, characterization, and reversible control by photosynthate supply. *Planta*, 226, pp.1299–310.



- Nägele, T. et al., 2012. Identification of a metabolic bottleneck for cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 72(1), pp.102–114. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2012.05064.x>.
- Nakai, T. et al., 1998. An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11. *Plant & Cell Physiology*, 39(12), pp.1337–1341.
- Newman, J.E., 1980. Climate change impacts on the growing season of the North American “Corn Belt.” *Biometeorology* 7, pp.128-42.
- Nhiri, M. et al., 2000. Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase during germination of Sorghum seeds: influence of NaCl and L-malate. *Plant Science*, 151, pp.29–37.
- Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., 1984. Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in Bryophyllum leaves: a possible covalent modification. *FEBS Letters*, 178, pp.199-203
- Nimmo, H., 2003. Control of phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. *Arch Biochem Biophys.*, 414, pp.189–196.
- De Nisi, P. & Zocchi, G., 2000. Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber *Cucumis sativus* L. roots under iron deficiency, activity and kinetic characterization. *Journal of Experimental Botany*, 51, pp.1903–1909.
- Núñez, J.G.A., Kronenberger, J., Wuilleme, S., Lepiniec, L., Rochat, C., 2008. Study of AtSUS2 localisation in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant Cell Physiology*, 49, pp.1621–1626.
- O’Hara, L.E., Paul, M.J. & Wingler, A., 2013. How do sugars regulate plant growth and development? new insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant*, 6(2), pp.261–274. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sss120>.
- O’Leary, M., 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist’s view. *Annual Review Plants Physiology*, 33, pp.297–315.

- O'Leary, B. et al., 2009. Bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) functions as a catalytic and regulatory subunit of the novel class-2 PEPC complex of vascular plants. *Journal of Biological Chemistry*, 284, (37), pp.24797–24805.
- O'Leary, B., Park, J. & Plaxton, W.C., 2011. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal*, 436(1), pp.15–34. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20110078>.
- Oaks, A., 1994. Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. *Plant Physiology*, 106, pp.407–414.
- Osuna, L. et al., 1996. In vivo and in vitro phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. *Plan Physiol*, 111, pp.551–558.
- Osuna, L. et al., 2004. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase with characteristics of protein kinase C in leaves and mesophyll cell protoplasts from *Digitaria Sanguinalis*: possible involvement in the C4-phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, pp.428–433.
- Parent, B. et al., 2010. Modelling temperature-compensated physiological rates, based on the co-ordination of responses to temperature of developmental processes. *Journal of Experimental Botany*, 61, pp.2057–2069.
- Peng, Y. et al., 2012. Multiple Inter-Kingdom Horizontal Gene Transfers in the Evolution of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene Family. *PLoS ONE*, 7(12), p.e51159. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051159>.
- Peters, W. et al., 1997. Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plan Physiol*, 151, pp.362–367.
- Pien, S., Wyrzykowska, J. & Fleming, A.J., 2001. Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. *The Plant Journal*, 25(6), pp.663–674. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319033>.
- Pierre, J. et al., 1992. Regulatory phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Sorghum* mesophyll cells and the role of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  as possible

- components of the light-transduction pathway. *European Journal of Biochemistry*, 210, pp.531–537.
- Pierre, J. et al., 2004. In situ C4 phosphoenolpyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *Digitaria sanguinalis* mesophyll cells. *Photosynth Res*, 79, pp.349–355.
- Pontis, H.G., 1977. Riddle of sucrose. *Plant Biochemistry*, University Park Press, Baltimore, pp.111-115.
- Poorter, H., Niinemets, U., Poorter, L., Wright, I.J. & Villar, R., 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist*, 182, pp.565–588.
- Popova, L.P., Losanka, P., Stoinova, Z.G., Maslenkova, L.T., 1995. Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14, pp. 211-218.
- Porter, J.R., 2005. Rising temperatures are likely to reduce crop yield. *Nature* 436, pp.174.
- Porchia, A., Curatti, L. & Salerno, G., 1994. Sucrose metabolism in cyanobacteria: sucrose synthase from *Anabaena* sp. strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence. *Planta*, 210(1), pp.34–40.
- Prasad, P.V. V., Staggenborg, S.A. & Ristic, Z., 2008. Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants. In L. R. Ahuja et al., eds. *Response of Crops to Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, pp. 301–355.
- Memoria proyecto Profit, 2003. Efecto del estrés térmico sobre la calidad de la remolacha de siembra otoñal. Estudio de las bases fisiológicas. *Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía*.
- Pugh, D. et al., 2010. Evidence for the role of transfer cells in the evolutionary increase of seed and fiber biomass yield in cotton. *Mol. Plant*, 3, pp.1075–86.

- Qi, a. et al., 2005. The Broom's Barn sugar beet growth model and its adaptation to soils with varied available water content. *European Journal of Agronomy*, 23(2), pp.108–122.
- Quick, W.P. et al., 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ*, 15(1), pp.25–35.
- Rao, S. et al., 2002. Photosynthetic and other phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C4 system of *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol.*, 130, pp.876–86.
- Rao, S., Reiskind, J. & Bowes, G., 2006. Light regulation of the photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C4 system of *Hydrilla verticillata*. *Plant Cell Physiology*, 9, pp.1206–1216.
- Rausch, T. & Greiner, S., 2004. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, pp.253–61.
- Reglamento Oficial de Recepción y Análisis. OM 10/10/1980, BOE día 13; y OM 07/06/1984, BOE día 9, de adaptación a la ley 19/77.
- Richardo, C.P.P., Rees, T., 1970. Invertase activity during development of carrot roots. *Phytochemistry* 9, pp.239-247.
- Rinaldi, M. & Horemans, S., 2014. Remolacha azucarera. In P. Steduto et al., eds. *Respuesta del rendimiento de los cultivos al agua*. pp. 207–213.
- Ritchie, J.T. & NeSmith, D.S., 1991. Temperature and crop development. *Modeling plant and soil systems-Agron. Monogr*, 31, pp.5–29.
- Rizhsky, L., Liang, H.J. & Mittler, R., 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, 130, pp.1143–1151.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. & Mittler, R., 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134, pp.1683–1696.
- Rosenzweig, C., 1985. Potential CO<sub>2</sub>-induced climate effects on North American wheat-producing regions. *Climatic Change*, 7, pp.367–389. Available at: <http://www.springerlink.com/index/X471450042R41VUX.pdf>.

Rosenzweig, C., Parry, M.L., 1994. Potential impact of climate change on world food supply. *Nature*, 367, pp.133–38.

Rosique, E., 2015. ¿Es posible la reducción de costes en la Remolacha del Sur? *Revista AIMCRA*, 122, pp.14–16.

Ross, H. a & Davies, H. V, 1992. Purification and Characterization of Sucrose Synthase from the Cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.*, 100(2), pp.1008–1013. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1075657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ruan, Y.-L. & Patrick, J., 1995. The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta*, 196, pp.434–44.

Ruan, Y.-L., Llewellyn, D. & Furbank, R., 2003. Suppression of sucrose synthase expression represses cotton fibre cell initiation, elongation and seed development. *Plant Cell*, 15, pp.952–64.

Ruan, Y.-L. et al., 2008. Expression of sucrose synthase in the developing endosperm is essential for early seed development in cotton. *Funct. Plant Biol.*, 35, pp.382–93.

Ruan, Y.L. et al., 2010a. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3(6), pp.942–955. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssq044>.

Ruan, Y.-L. et al., 2010b. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Mol. Plant*, 3, pp.942–55.

Ruan, Y.L. et al., 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, 17(11), pp.656–665. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.005>.

Ruan, Y.-L., 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual review of plant biology*, 65, pp.33–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579990>.

Rubio, J.L., Millán, M., 2005. [http://www.gva.es/ceam/press/press\\_PDF/Novopress\\_2005\\_02\\_14.pdf](http://www.gva.es/ceam/press/press_PDF/Novopress_2005_02_14.pdf)

- Ruiz Ballesta, I.M. et al., 2014. In vivo monoubiquitination of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase occurs at Lys624 in germinating sorghum seeds. *Journal of experimental botany*, 65(2), pp.443–451.
- Sadowsky, M. et al., 2012. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*, 64, pp.136–42.
- Sadras, V. & Milroy, S., 1996. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: a review. *Field Crops Research*, 47, pp.253–266.
- Sage, R.F. & Kubien, D.S., 2007. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 30, pp.1086–1106.
- Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. & Prado, F.E., 1980. A regulatory invertase from sugar cane leaf-sheaths. *Phytochemistry*, 19(8), pp.1637–1642.
- Sánchez, R., & Cejudo, F., 2003. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 132 (June), pp.949–957. <http://doi.org/10.1104/pp.102.019653.1997>
- Sánchez, R., Flores, A. & Cejudo, F.J., 2006. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 223(5), pp.901–909. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-005-0144-5>.
- Schnell, J. D., & Hicke, L., 2003. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.35857–35860.
- Schwimmer, S., Makower, R., Rorem, E.S., 1961. Invertase & invertase inhibitor en potato. *Plant Physiology*, 36, pp.313.
- Sergeeva, L. et al., 2006. Vacuolar invertase regulates elongation of Arabidopsis thaliana roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, pp.2994–99.
- Shane, M., Fedosejevs, E. & Plaxton, W., 2013. Reciprocal control of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase by in vivo monoubiquitination and phosphorylation in developing proteoid roots of phosphate deficient Harsh Hakea. *Plant Physiol*, 161, pp.1634–44.

- Sharkey, T.D., 2000. PLANT BIOLOGY: Some Like It Hot. *Science*, 287(5452), pp.435–437.  
Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5452.435>.
- Sharp, R., Hsiao, T. & Silk, W., 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials 1 ii. role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, 93, pp.1337–1346.
- Shaw, B., Thomas, T.H. & Cooke, D.T., 2002. Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress. *Plant Growth Regulation*, 37, pp.77–83.
- Sherson, S. et al., 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 54, pp.525–531.
- Schultz, V., Sussman, I., Bokvist, K., Tornheim, K., 1993. Bioluminometric assay of ADP and ATP at high ATP/ADP ratios: assay of ADP after enzymatic removal of ATP. *Analytical Biochemistry*, 215, pp.302–304.
- Silvius, J.E. & Snyder, F.W., 1979. Comparative Enzymic Studies of Sucrose Metabolism in the Taproots and Fibrous Roots of *Beta vulgaris* L. *Plant physiology*, 64(6), pp.1070–1073.
- Smit, B. & Skinner, M.W., 2002. Adaptation Options in Agriculture To Climate Change : a. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 7(UNFCCC 1992), pp.85–114.  
Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11027-008-9156-3>.
- Smith, L. et al., 1996. Light regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in barley mesophyll protoplasts is modulated by protein synthesis and calcium, an not necessarily correlated with phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity. *Planta*, 200, pp.174–180.
- Soffe, R.J., 2003. Crop Physiology, pp. 63-76. *The Agricultural Notebook*. 20 th edición. Ed. Blackwell Science.
- Staehelin, L., 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant Journal*, 11, pp.1151–1165.
- Stiborova, M. & Leblova, S., 1986. Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Letters*, 205, pp.32–34.
- Stirzaker, R.J. & Passioura, J.B., 1996. The water relations of the root–soil interface. *Plant Cell Environ*, 19(2), pp.201–208.

- Sturm, A., 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant physiology*, 121, pp.1–7.
- Sturm, A. & Tang, G.Q., 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, 4(10), pp.401–407.
- Subbaiah, C., Palaniappan, A., Duncan, K., Rhoads, D., Huber, S., Sachs, M. 2006. Mitochondrial localisation and putative signalling function of sucrose synthase in maize. *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp.15625–15635.
- Sullivan, S., Jenkins, G.I. & Nimmo, H.G., 2004. Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean. *Plant physiology*, 135, pp.2078–2087.
- Suzuki, N. et al., 2013. Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Absciscic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants. *The Plant Cell*, 25(9), pp.3553–3569. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.114595>.
- Svensson, P., Bläsing, O. & Westhoff, P., 2003. Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys.*, 414, pp.180–188.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2006, *Plant Physiology and Development* 4th edition, 4<sup>a</sup>. A.D. Sinaue, ed., Sinauer Associates, Inc.
- Taiz, L. et al., 2015. *Plant Physiology and Development* 6th edition. A. D. Sinauer, ed., Sinauer Associates, Inc. Available at: <http://6e.plantphys.net/index.html>.
- Tanase, K. & Yamaki, S., 2000. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit. *Plant Cell Physiology*, Apr;41(4), pp.408–14.
- Tang, A. & Boyer, J., 2002. Growth-induced water potentials and the growth of maize leaves. *Journal of Experimental Biology*, 53, pp.489–503.
- Tang, G., Luscher, M. & Sturm, A., 1999. Antisense repression and vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell*, 11, pp.177–89.
- Tardieu, F., Granier, C. & Muller, B., 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment, are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? *New Phytologist*, 143, pp.33–43.



- Tardieu, F. et al., 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves, a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 51, pp.1505–1514.
- Terry, N., 1968. Growth, Developmental physiology of sugar beet. I. The influence of light and temperature on growth. *Journal of experimental botany*, 19, pp.795–811.
- Terry, N., 1970. Developmental physiology of sugar beet. I. Effects of temperature and nitrogen supply on the growth, soluble carbohydrate content and nitrogen content of leaves and roots. *Journal of experimental botany*, 21, pp.477–496.
- Teulat, B., Borries, C. & This, D., 2001. New QTLs identified for plant water status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1), pp.161–170.
- Thuiller, W., Lavorel, S., Araujo, M.B., Sykes, M.T. & Prentice I.C., 2005. Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp.8245–8250
- Timpa, J.D. et al., 1986. Effects of water stress on the organic Acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant physiology*, 82(3), pp.724–728.
- Tisne, S., Schmalenbach, I., Reymond, M., Dauzat, M., Pervent, M., Vile, D. & Granier, C., 2010. Keep on growing under drought: genetic and developmental bases of the response of rosette area using a recombinant inbred line population. *Plant, Cell & Environment*, 33, pp. 1875–1887.
- Tsai, C.Y., 1974. Sucrose-UDP glucosyltransferase of *Zea mays* endosperm. *Phytochemistry*, 13, pp.885–891.
- Toh, H., Kaamura, T. & Izui, K., 1994. Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plan Cell Environ*, 17, pp.31–43.
- Tripodi, K. et al., 2005. In vivo regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. *Plant physiology*.
- Tymowska-Lalanne, Z., Kreis, M., 1997. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, 28, pp.71–117.

- Uhrig, R.G. et al., 2008. Regulatory Monoubiquitination of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Germinating Castor Oil Seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp.29650–29657. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M806102200>.
- Van Zanten, M., Voesenek, L.A., Peeters, A.J. & Millenaar, F.F., 2009. Hormone- and light-mediated regulation of heat-induced differential petiole growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 151, pp.1446–1458.
- Vidal, J. & Chollet, R., 1997. Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase. *Trends Plant Science*, 2, pp.230–237.
- Vidal, J., Jeanneau, M., Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Hodges, M., Gerentes, D. & Perez, P., 2002. Manipulating PEPC levels in plants. *Journal Experimental Botany*, 53, pp.1837-1845.
- Vile, D. et al., 2012. Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects? *Plant, Cell and Environment*, 35(4), pp.702–718.
- Villariás, J.L., 1996. El cultivo de la remolacha azucarera en Salamanca. Ediciones Agrotécnicas, Madrid.
- Villariás Moradillo, J.L., 1999a. *Remolacha azucarera* Ediciones., Madrid.
- Villariás Moradillo, J.L., 1999b. *Compendio práctico del cultivo de la remolacha azucarera*, Madrid : Ediciones Agrotécnicas. Available at: [http://ccuc.cbuc.cat/record=b2389160~S23\\*cat](http://ccuc.cbuc.cat/record=b2389160~S23*cat) [Accessed October 9, 2015].
- Wächter, R. et al., 2003. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant physiology*, 133(3), pp.1024–1037.
- Wahid, A., & Close, T. J. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum*, 51 (1), pp.104-109. <http://doi.org/10.1007/s10535-007-0021-0>
- Walker, G., Ku, M. & Edwards, G., 1986. Activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxilase in relation to tautomerization and nonenzymatic decarboxylation of oxaloacetate. *Arch Biochem Biophys.*, 248, pp.489–501.

- Wang, L. & Ruan, Y.-L., 2012. New insights into roles of cell wall invertase in early seed development revealed by comprehensive spatial and temporal expression patterns of GhCWIN1 in cotton. *Plant Physiol.*, 160, pp.777–87.
- Wang, X.C. et al., 1994. Kinetic characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase extracted from whole-leaf and from guard-cell protoplasts of *Vicia faba* L. (C3 plant) with respect to tissue pre-illumination. *Histochem J*, 26(2), pp.152–160. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8150661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8150661).
- Wachter, R., Langhans, M., Aloni, R., Gotz, S., Weilmunster, A., Koops, A., Temguia, L., Mistrik, I., Pavlovkin, J., Rascher, U., et al, 2003. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 133, pp.1024–1037.
- Watson, RT and the Core Writing Team IPCC (2001). Climate Change 2001: Synthesis Report. *Third Assessment Report Climate Change 2001. Geneva, Switzerland*. pp.184.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U., 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal*, 10, pp.823–34.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U., 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, pp.253–79.
- Wedding, R.T., Black, M.K. & Meyer, C.R., 1989. Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate. *Plant physiology*, 90, pp.648–652.
- Welham, T. et al., 2009. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.*, 60 (12), pp.3353–3365.
- Weschke, W. et al., 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal*, pp.395–411.
- Willeford, K. et al., 1990. The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Influence of Mg-PEP and malate on the

- oligomeric equilibrium of PEP carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 168, pp.778–785.
- Winter, H., Huber, J.L., Huber, S.C., 1998. Identification of sucrose synthase as an actin binding protein. *FEBS Letters*, 440, pp. 205-208.
- Winter, H. & Huber, S.C., 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. n° y pp?
- Wobus, U. & Weber, H., 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chemi.*, 390, pp.937–944.
- Wu, G.-Q. et al., 2015. Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* ZxNHX and ZxVP1-1 confers enhanced salinity tolerance in chimeric sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6(July), pp.1–11. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00581/abstract>.
- Xiang, L. et al., 2011. Exploring the neutral invertase–oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 62, pp.3849–62.
- Xu, D.P. et al., 1989. Characterization of Sucrolysis via the Uridine Diphosphate and Pyrophosphate-Dependent Sucrose Synthase Pathway. *Plant physiology*, 90(2), pp.635–642.
- Xu, X., Zhang, Y. & Wang, Z., 2003. Effect of heat stress during grain filling on phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase / oxygenase activities of various green organs in winter wheat. *Photosynthetica*, 42 (2), pp.317-320.
- Xu, W. et al., 2006. The importance of the strictly conserved, C-terminal glycine residue in phosphoenolpyruvate carboxylase for overall catalysis: Mutagenesis and truncation of GLY-961 in the sorghum C4 leaf isoform. *Journal of Biological Chemistry*. n° y pp?
- Xu, S. et al., 2012. Overexpression of a potato sucrose synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production. *Mol. Plant*, 5, pp.430–41.
- Yeo, a, 1998. Molecular Biology of Salt Tolerance in the Context of Whole- Plant Physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49(323), pp.915–929.

- Zavala M (1994). Influencia del soleado sobre la calidad de la raíz. Tordesillas.
- Zeng, Y. et al., 1998. Differential Regulation of Sugar-Sensitive Sucrose Synthases by Hypoxia and Anoxia Indicate Complementary Transcriptional and Posttranscriptional Responses1. *Plant physiology*, 116(4), pp.1573–1583.
- Zhang, X.Q., Li, B. & Chollet, R., 1995. In Vivo Regulatory Phosphorylation of Soybean Nodule Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant physiology*, 108, pp. 1561-1568.
- Zhang, X.Q., Lund, A., Sarath, G., Cerny, R., Roberts, D. & Collet, R., 1999. Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): further analysis of its phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 371, pp.70-82.
- Zhu, Y.J., Komor. E., Moore, P.H., 1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiology*, 115, pp.609-616.
- Zrenner, R. & Stitt, M., 1991. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell Environ*, 14(9), pp.939–946.
- Zrenner, R. et al., 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal*, 7, pp.97–107.



## **AGRADECIMIENTOS**



## **“¿PARA QUE SIRVE UNA TESIS?”**

En estas intensas semanas acabando de componer el trabajo para presentar mi tesis doctoral, me acordaba de la película “¿Para qué sirve un oso?”. Echando horas infinitas frente al ordenador, entrando en “meditación científica”...¿Qué hago yo aquí? En nuestro país, como los osos, las tesis también están en peligro de extinción. Cada vez hay menos recursos económicos y menos posibilidades, para personas con una inmensa capacidad de trabajo, superación y sentido crítico, de hacer ciencia. A nuestra sociedad del progreso le cuesta ver la importancia de lo que no genera un beneficio inmediato...Si no sabes mirar, claro. Porque la ciencia y los científicos generan una red no sólo de conocimientos, sino de creatividad, colaboración y esfuerzo, que también le hace mucha falta a nuestro mundo.

¿Y que ha supuesto en mi vida la tesis? Igual que en el ecosistema científico, a pequeña escala, la decisión de investigar ha tejido una hermosa red en mi vida. En estos diez años gran parte de mis aventuras se las debo a las ganas y la decisión de investigar. He viajado, he participado en congresos y he ayudado a organizarlos, montamos una ONG, contribuimos a la conservación de los manglares, hemos trabajado por el desarrollo de los pueblos, he conocido la selva, hemos escrito un libro, me he enamorado, he sacado unas oposiciones, he sido profe en la universidad de Sevilla, en la UNAM-León de Nicaragua y en las Vegas. Y he compartido la vida con gente maravillosa.

Al igual que mis queridas plantas, este esfuerzo de la tesis y la investigación, requiere de mecanismos de homeostasis, amortiguadores, enzimas y osmolitos que te ayuden a ser feliz y a generar cosas bonitas a tu alrededor a pesar del estrés. Así que gracias a todas las personas que han formado y forman parte de mi vida y me han cuidado, enseñado, provocado y querido, para que este proceso tenga un broche de oro.

Como esto va de ciencia, gracias en primer lugar a mis jefes de tesis: A la Dra. Cristina Echevarría, que me ha acompañado y guiado en este camino, a veces incierto, de la ciencia. Me admira su capacidad de mirar los datos desde una perspectiva totalmente nueva. Científica hasta la médula! Pero conmigo se que ha hecho un acto de fe! Y me ha apoyado aun cuando todo parecía ir en contra. La quiero mucho, y se que ella también a mí.

Al Dr. Juan José Martínez, con el que compartí de compañero los primeros pasos con la remolacha y me desveló los secretos del cultivo, los agricultores, me enseñó a “pensar como una remolacha”. Sin su “magia” con los datos y la estadística no podría haber escrito esta tesis.

A la Dr. Ana Belén Feria, mi amiga y compañera. Recuerdo como me ayudó a comprender el primer artículo científico sobre la PEPC, que me permitió ser seleccionada para la beca del departamento. Siempre me ha ayudado a sentirme como en casa en el departamento y su apuesta de vida por la ciencia es un ejemplo a seguir.



Al personal de AIMCRA de Sevilla, en especial al Dr. Rodrigo Morillo-Velarde, por su colaboración y confianza, por potenciar ideas valientes y escasas en nuestra Comunidad Autónoma, de colaboración entre empresas y universidades.

Gracias a mi familia, mis hermanos Pedrito, Cristina, Keli, Marta, mis padres, Loli y Pedro, a mi hermanita Laura, una persona maravillosa, una explosión de creatividad que pone poesía en lo que hace. A mis titos, tías, primos y primas. Ellos me han enseñado a ser valiente y a confiar en mis capacidades. Ha sido fundamental que siempre estén de mi parte y se sienten orgullosos de mí.

A mi amor, Sergi, con el que construyo cada día una vida maravillosa, un hogar donde caben todas las locuras que nos hagan crecer y aportar cosas buenas al mundo, donde la libertad y el amor nos hacen fuertes. Muchas gracias.

Al resto de mi manada, siempre les ha hecho gracia “que la remolacha se estrese”, bueno y que yo lo investigue. Me quieren, encontrarnos es volver a casa y saber que las cosas difíciles lo son menos con amigos: la incondicional Pili, la inteligente Amparo, la valiente Mari Carmen, el cariñoso Curro, los generosos Estela y Oscar, Xaro y Adriano cuidadores y cultísimos, Sergio vencedor de dificultades, Dani espíritu científico y feliz, Caro tierna y serena, mi querido David, orientador y achuchador de corazones, mi hermana Nuria y el resto de mi familia de la Bahía, tan buena, tan guapa y tan luchadora, Javier, María, Lola, Mariquilla, Manuela, Rafa, Pedro, Xano... Muchas gracias.

A mi compañero de vida, Eduardo. Él fue el primero con la remolacha en el departamento y yo continué su tesis. Parece imposible lo que hemos hecho desde entonces. El me cogió de la mano para recorrer caminos impensables, cumplir sueños, vivir aventuras y luchar por la justicia. Es brillante, honesto y bueno hasta lo más profundo. Te quiero, muchas gracias por ayudarme a superar mis propios límites. Y por ser un ejemplo para el mundo.

A todos y todas mis compañeras del departamento, que me han enseñado a cacharrear, a pensar experimentos, a interpretar, a medir, a generar ciencia... Es maravilloso poder friquear sobre la PEPC tomando cervezas! La disponibilidad de Rosario y Jacinto, la eficacia y cercanía de Pilar, la alegría y el cariño de Monre, la acogida de Isa, Cire, Guille, las ayudas de Alfredo y Alfonso, el humor de Paco, la experiencia de José María y Ángel. Y sobre todo a Sofía. Su claridad de pensamiento, su bondad y disponibilidad no tienen límites, me encanta su capacidad para superarse a sí misma. Sin ella la aventura de Nicaragua no hubiera sido posible.

A todos los científicos, científicas y estudiantes con los que he compartido momentos muy intensos, ricos, brillantes, personas que forman parte de la red de cosas buenas que se generan en torno a la ciencia, los proyectos, las personas: mis queridos Vanesa, Raquel, Rodol, Claudia, Xochilt... que me han hecho dejar trocitos de mi corazón por el mundo. Los demás profesores Nicaraguenses: M<sup>a</sup> Inés, Rebeca, Rolando, Nancy, Claudia, que han sido un ejemplo de superación y de cariño. Todas las personas que nos han acompañado en los proyectos de

cooperación, que han creado una ola de relaciones hermosas e ideas luminosas: Blanca, Irene, Tere, Capea, Mari, Álvaro, Celeste, Marisol y Domingo, Ignacio, Bea, José María, Antonio, Oscar.

A los jóvenes que he conocido en lugares hostiles, con un futuro incierto, que son diamantes en el barro, auténticos héroes... Y que me enseñan tanto... Han sido fundamentales para elegir mi profesión, “maestra”, porque hacen que cada día quiera ser mejor persona para enfrentarme con honestidad a la tarea de acompañar vidas. Gracias a los chicos y chicas de Salinas Grandes (Andrea, Brenda, Byron, Sofía...), de la Peñitas (Reiner, Roberto, Karla...) y a mis niños de las Vegas (Josué, Nino, Rosario, Rosana, “Gorje”, Elena, Cristina, Triana...). Y a los compañeros de profesión con los que he compartido sueños y momentos brillantes en esta difícil tarea: Rosa, Juana, Maite, Bea, Antonio, Carlos...

Y a las personas valientes, que no se rinden y quieren volver a hacer del mundo lugar en equilibrio. Porque esa es nuestra auténtica naturaleza.

Gracias a todos por formar parte de mi historia, una historia que merece la pena ser vivida.

Arancha León

